

Aus dem Zentrum für Radiologie
Direktor: Prof. Dr. med. Klose
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort: Marburg

**MOLEKULARE *IN VIVO* FLUORESZENZBILDGEBUNG ZUR
DARSTELLUNG VON ERBB/HER2- UND CCK2-REZEPTORPOSITIVEN
TUMOREN IM TIERMODELL**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Nadine Tischer
aus Celle

Marburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am 29.02.2008.
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund
Referent: Prof. Dr. med. H. Alfke
Korreferent: Prof. Dr. med. H. Renz

Meinen Eltern und Christian
Für ihre anhaltende Unterstützung und Liebe

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1.	Moderne Bildgebungsverfahren im Überblick	- 1 -
1.2.	Molekulare Fluoreszenzbildgebung mit Nahinfrarotlicht	- 3 -
1.3.	CyDyes™ (monoreaktive NHS-Ester)	- 8 -
1.4.	Der CCK-Rezeptor - Vorkommen und Funktion	- 10 -
1.5.	CCK2-Rezeptor : seine Liganden zur Darstellung CCK2positiven Gewebes in szintigraphischen Verfahren	- 15 -
1.6.	Der ErbB/Her2-Rezeptor: sein Vorkommen, seine Funktion	- 17 -
1.7.	Herceptin® - ein Antikörper gegen den ErbB/Her2neu-Rezeptor und seine Rolle in der Therapie des Mammakarzinoms	- 21 -
1.8.	Ziele der Arbeit	- 23 -

2. Materialien und Methoden

2.1.	Materialien	- 24 -
2.1.1.	Allgemeine Laborgeräte	- 24 -
2.1.2.	Zellkulturgeräte	- 25 -
2.1.3.	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	- 26 -
2.1.4.	Zellkulturmaterialien	- 27 -
2.1.5.	Zellkulturmedien und Zusätze	- 28 -
2.1.6.	Tierversuche	- 28 -
2.1.7.	Spezielle Analysengeräte	- 29 -
2.1.8.	Spezielle Chemikalien	- 30 -
2.1.9.	Computerprogramme	- 31 -
2.2.	Methoden	- 32 -
2.2.1.	Synthese von Cy5.5-Minigastrin	- 32 -

2.2.2. Aufreinigung von Cy5.5-Minigastrin	- 32 -
2.2.3. Synthese von Cy5.5-Herceptin®	- 33 -
2.2.4. Aufreinigung von Cy5.5-Herceptin®	- 34 -
2.2.5. Herstellung der F(ab'), F(ab') ₂ -Fragmente von Herceptin®	- 34 -
2.2.6. Synthese und Aufreinigung der Cy5.5-F(ab') ₂ -Frag. von Herceptin	- 36 -
2.2.7. Synthese und Aufreinigung der Cy5.5-F(ab')-Frag. des Herceptins	- 37 -
2.2.8. Zellkultur	- 37 -
2.2.9. Zellversuche zur IC ₅₀ -Bestimmung	- 38 -
2.2.10. Konfokale Mikroskopie	- 41 -
2.2.11. Tierversuche	- 42 -
3. Ergebnisse	
3.1.1. Synthese von Cy5.5-D-Glu ¹ -Minigastrin	- 45 -
3.1.2. Bindungsstudie Cy5.5-Minigastrin	- 47 -
3.1.3. Tierversuche mit Cy5.5-Minigastrin	- 48 -
3.2.1. Synthese Cy5.5-Herceptin®	- 52 -
3.2.2. Bindungsstudie mit Cy5.5-Herceptin®	- 53 -
3.2.3. Konfokale Mikroskopie von Cy5.5-Herceptin®	- 56 -
3.2.4. Tierversuche mit Cy5.5-Herceptin®	- 59 -
3.3.1. Herstellen der F(ab') ₂ – Fragmente von Herceptin®	- 65 -
3.3.2. Synthese von Cy5.5-F(ab') ₂	- 66 -
3.3.3. Bindungsstudie mit Cy5.5-F(ab') ₂	- 68 -
3.3.4. Mikroskopie F(ab') ₂ – Fragmente von Herceptin®	- 70 -
3.3.5. Tierversuche mit Cy5.5-F(ab') ₂ -Fragmenten von Herceptin®	- 73 -
3.4.1. Herstellen der F(ab')-Fragmente von Herceptin®	- 79 -
3.4.2. Synthese Cy5.5-F(ab')- Fragmente	- 80 -

3.4.3. Bindungsversuche Cy5.5-F(ab')- Fragmente	- 82 -
3.4.4. Konfokale Mikroskopie mit Cy5.5-F(ab')-Frag. von Herceptin®	- 85 -
3.4.5. Tierversuche mit Cy5.5-F(ab')-Fragmenten von Herceptin®	- 88 -
4. Diskussion	- 95 -
5. Zusammenfassung	- 103 -
6. Summary	- 105 -
7. Literaturverzeichnis	- 107 -
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	
8.1. Abbildungsverzeichnis	- 115 -
8.2. Tabellenverzeichnis	- 123 -
9. Abkürzungsverzeichnis	- 124 -
10. Verzeichnis meiner akademischen Lehrer	- 128 -
11. Danksagung	- 129 -

1. Einleitung

1.1. Moderne Bildgebungsverfahren im Überblick

Heute sind moderne Bildgebungsverfahren integraler Bestandteil der medizinischen Diagnostik. Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) und szintigraphische Verfahren liefern einen Einblick in anatomische und funktionelle Eigenschaften verschiedener Gewebe. Eine neuere Methode, die bislang nur beschränkten Eingang in die klinische Diagnostik gefunden hat, ist die molekulare Fluoreszenzbildgebung mittels Nahinfrarotlicht.

Die Computertomographie liefert überlagerungsfreie Schnittbilder mit hoher Auflösung und kann in Kombination mit Kontrastmitteln auch Aussagen über die Funktion von Organen machen, jedoch mit einer eher eingeschränkten Aussagekraft. Ein weiterer Nachteil der Computertomographie ist die Strahlenexposition, die höher als bei konventionellen Röntgenaufnahmen ist. Bei der CT werden durch unterschiedliche Absorption von Röntgenstrahlen Dichteunterschiede gemessen. Computertomographien zeigen knöcherne Strukturen und die Feinstruktur der Lunge besonders deutlich. Ein Vorteil der CT liegt in der schnellen Durchführung; ein Ganzkörper-CT kann in wenigen Sekunden bis Minuten aufgenommen werden. Darüber hinaus können unter CT-Kontrolle auch therapeutische und diagnostische Interventionen, wie etwa Chemoembolisationen von Lebertumoren, Vertebroplastien oder Biopsien durchgeführt werden (Reiser et al, 2004).

Die Magnetresonanztomographie (MRT), oder auch Kernspintomographie, liefert ebenfalls Schnittbilder des Körpers; eine Strahlenbelastung durch Röntgenstrahlung ist bei dieser Methode nicht vorhanden, da hier keine Röntgenstrahlenabsorptionen, sondern Kernresonanzen gemessen werden. Mittels eingestrahlter Hochfrequenzimpulse werden sich in einem Magnetfeld

befindende Wasserstoffkerne angeregt und erzeugen messbare Magnetfeldänderungen. Je nach chemischer Umgebung des Wasserstoffs und Stärke des Magnetfelds werden unterschiedliche Kernresonanzen gemessen, so dass auf diesem Weg die Gewebezusammensetzung ermittelt werden kann; im MRT können dadurch sehr gut verschiedene Weichteilgewebe voneinander abgegrenzt werden. Die Durchführung therapeutischer Maßnahmen ist beim MRT nur schwer möglich, da aufgrund der starken Magnetfelder metallische Gegenstände nicht eingesetzt werden können. Metallimplantate führen zu starken Artefakten bei der Bildgebung. Patienten mit implantierten Herzschrittmachern und Cochlearimplantaten dürfen nicht im MRT untersucht werden, da diese dauerhaft in der Funktion gestört werden und sich durch die Magnetkräfte, die Sondenlage der Geräte verändern könnte. Auch die Durchführung einer MRT-Aufnahme dauert mit 10-80 min im Vergleich zu einer CT deutlich länger (Reiser et al., 2004).

Szintigraphische Verfahren dagegen geben Auskunft über die Funktion verschiedener Organe, wie beispielsweise bei der Schilddrüsen- oder der Knochenszintigraphie. Hier werden Erkenntnisse über gesteigerte oder verminderte Stoffwechselprozesse gewonnen. Mit der Somatostatinrezeptorszintigraphie (SRS) können Tumore, die Somatostatinrezeptoren exprimieren, und deren Metastasen detektiert werden. Es handelt sich dabei hauptsächlich um neuroendokrine Tumore, mit Ausnahme von Insulinomen (Gotthardt, Boermann, 2004). Radioaktivmarkierte Tracer werden dem Patienten verabreicht und die von den verwendeten Radionukliden emittierte γ -Strahlung wird mittels einer γ -Kamera detektiert. So kann die Anreicherung der Nuklide im Gewebe und auch ihre Ausscheidung beobachtet werden. Weiterentwicklungen der Szintigraphie sind SPECT (*Single-Photon-Emission-Computer-Tomographie*) und PET (*Positronen-Emissions-Computer-Tomographie*), bei denen die tomographische Methode zur Berechnung eines dreidimensionalen Bildes herangezogen wird. Nachteil der szintigraphischen Verfahren ist die Strahlenexposition, die jedoch in den meisten Fällen geringer als bei einer computertomographischen Untersuchung ist, und die geringe

Auflösung der Verfahren. Bei PET und Szintigraphien als alleinige Untersuchungen ist oft keine exakte Ortsbestimmung des Befundes möglich. Nur die Kombination von PET und CT zum PET/CT, bei dem in derselben Untersuchung gleichzeitig zum PET ein Niedrigdosis (*low dose*) CT akquiriert wird, lässt eine Aussage zur Lokalisation des Befundes zu.

1.2. Molekulare Fluoreszenzbildgebung mit Nahinfrarotlicht

(*Molecular fluorescence imaging with near-infrared light (NIRF)*)

Von Interesse sind nicht nur die anatomischen und funktionellen, wie beim CT oder MRT, sondern auch die biochemischen Eigenschaften der verschiedenen Gewebe, wie zum Beispiel der Rezeptorstatus oder die Enzymaktivitäten. Informationen, die beispielsweise für eine hochselektive Tumorthherapie von großer Wichtigkeit sein können.

Die Möglichkeit der Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an biochemische Marker macht die Fluoreszenzbildgebung interessant. Fluoreszenzbildgebung mit nahinfrarotem (NIR) Licht könnte sich in den nächsten Jahren zu einem weiteren wichtigen Verfahren in der medizinischen Diagnostik entwickeln.

Bereits heute findet die Fluoreszenzbildgebung breite Anwendung in der biologischen und medizinischen Forschung.

Auf zellulärer und subzellulärer Ebene lässt sich Fluoreszenz mittels konfokaler Mikroskopie sichtbar machen (Korlach et al., 1999), aber auch Multiphotonenmikroskopie und intravitale Mikroskopie spielen eine Rolle (König, 2000). Auf diese Verfahren soll hier nicht weiter eingegangen werden.

Die *in vitro* Fluoreszenzbildgebung ist eine Methode mit sehr hoher Empfindlichkeit, schon geringe Konzentrationen biochemischer Marker im Bereich von 10^{-9} - 10^{-12} mol/l können detektiert werden, was einen Vorteil gegenüber anderen Verfahren darstellt. *In vivo* ist die Sensitivität abhängig von der Menge bzw. Größe und Lokalisation der untersuchten Marker. Die

Sensitivität der Magnetresonanzbildgebung ist mit 10^{-3} - 10^{-5} mol/l deutlich geringer. Die Sensitivitäten des PET und des SPECT liegen mit 10^{-11} - 10^{-12} mol/l für das PET und 10^{-10} - 10^{-11} mol/l für das SPECT in einem mit der NIR-Fluoreszenzbildgebung vergleichbaren Bereich (Massoud, Gambhir, 2003). Die Fluoreszenzmarkierung ist eine einfach durchzuführende Reaktion und die fluoreszenzfarbstoffmarkierten Moleküle sind über längere Zeit stabil, darüber hinaus besteht kein Entsorgungsproblem, wie es bei radioaktivmarkierten Tracern auftritt. Eine Strahlenbelastung für den Patienten entfällt bei diesem Verfahren.

Von besonderem Interesse im Rahmen der Fluoreszenzbildgebung sind Methoden, die *in vivo* Diagnostik in tiefer liegenden Zellschichten möglich machen (Ntziachristos et al., 2003). Ein wichtiger Meilenstein hierfür war die Entwicklung von Fluoreszenzfarbstoffen, die im nahinfraroten (NIR) Bereich des elektromagnetischen Spektrums emittieren. Die NIR-Strahlung wird nur zu einem geringen Prozentsatz durch das Gewebe selbst absorbiert, was eine ausgezeichnete Empfindlichkeit der Methode auch in tieferen Gewebsschichten bewirkt. Die Abbildung 1.1 zeigt, dass Hämoglobin und Wasser, die Stoffe, die am stärksten sichtbares und infrarotes Licht im Gewebe absorbieren, im NIR-Bereich (650-900 nm) den niedrigsten Absorptionskoeffizienten aufweisen (Weissleder, 2001).

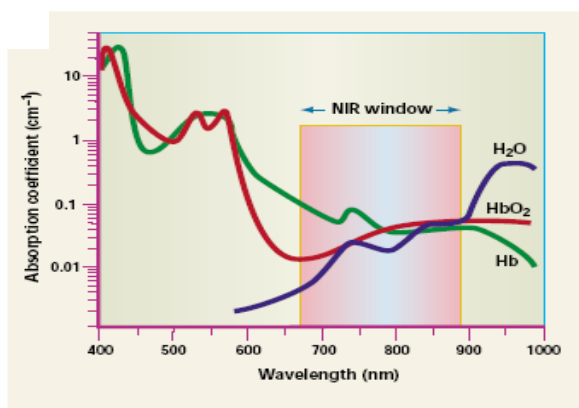


Abb. 1.1: Absorptionsspektren von Wasser, oxygeniertem und desoxygeniertem Hämoglobin (Weissleder, 2001).

Die Anregung der Fluorochrome erfolgt durch monochromatisches Licht einer bestimmten Wellenlänge, entweder mittels Laser, oder durch Xenon- und Wolframlampen (*white light sources*), die durch spezielle Filter monochromatisiert werden.

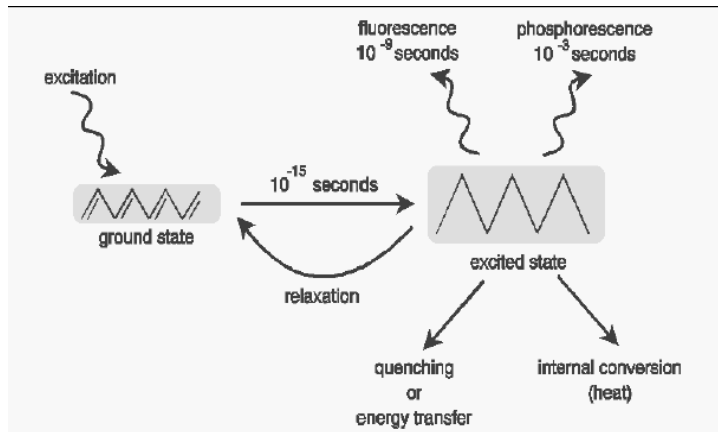


Abb. 1.2: Der Fluoreszenz-Prozess, (aus Amersham pharmacia biotech: *Fluorescence*).

Wie in der oben stehenden Abbildung dargestellt, führt die Absorption eines Photons mit der passenden Energie durch den Fluoreszenzfarbstoff dazu, dass ein Elektron des Fluorochroms aus seinem Grundzustand in einen Zustand höherer Energie, den Anregungszustand, überführt wird. Wenn das Elektron in seinen Grundzustand zurückfällt, emittiert der Fluoreszenzfarbstoff elektromagnetische Strahlung anderer Wellenlänge als derjenigen, mit der er angeregt wurde. Das Emissionsspektrum eines Fluorochroms ist im Gegensatz zum Absorptionsspektrum in den längerwelligen Bereich verschoben (*Stokes shift*). Diese Verschiebung macht es möglich das Anregungslicht mittels Emissionsfilter (*longpass*-, *shortpass*- oder *bandpass*-Filter) von dem emittierten Licht zu trennen. Dieses wird schließlich von einer hochsensitiven CCD (*charge-coupled-device*)-Kamera detektiert.

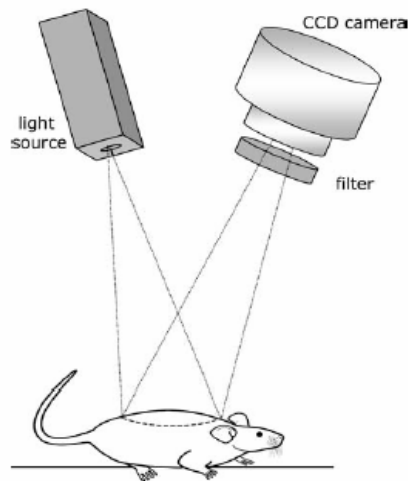


Abb. 1.3: Typisches *fluorescence reflectance imaging* System. Die Lichtquelle und die CCD-Kamera befinden sich auf derselben Seite des betrachteten Tiers. Alle Komponenten befinden sich üblicherweise in einer lichtundurchlässigen Box (Ntziachristos et al., 2003).

Nach diesem eben vorgestellten Prinzip wurden inzwischen viele verschiedene Anwendungen entwickelt.

Fluorescence reflectance imaging (FRI) macht die makroskopische Beobachtung von Fluoreszenzsignalen am lebenden Tier möglich, sofern die Signale oberflächennah entstehen. Ein typisches *fluorescence reflectance imaging* System ist in Abb. 1.3 abgebildet. Die Fluoreszenzbilder werden photographisch durch Aufzeichnung des vom Fluorochrom emittierten Lichts gewonnen. Mit dieser Methode wurden bereits verschiedene Enzymaktivitäten, wie die von Kathepsinen oder Metalloproteasen nachgewiesen (Tung, 1999; Bremer, 2001).

Der Vorteil dieser Methode ist die Einfachheit des Versuchsaufbaus, der es möglich macht, mehrere Tiere schnell und zur gleichen Zeit zu untersuchen.

Eine Beschränkung der FRI-Technik liegt in der Auflösung. Obwohl die Eindringtiefe des NIR-Lichts theoretisch bei mehreren Zentimetern liegen sollte (Ntziachristos, Ripoll, Weissleder, 2002), ist sie hier auf fünf bis acht Millimeter begrenzt. Die Gründe liegen darin, dass in einem Bild die Informationen aus

vielen Zellschichten zusammengefasst werden, und dass das Licht des sichtbaren und infraroten Bereichs vom Gewebe gestreut wird (Rayleigh-Streuung). Die Technik lässt keine quantitative Bestimmung der Fluoreszenzkonzentration und Größe des fluoreszierenden Bereichs zu.

Aus diesen Gründen ist das tomographische Verfahren der molekularen Fluoreszenztomographie (*fluorescence mediated molecular tomography* (FMT)) entwickelt worden, welches eine volumetrische Messung zulässt (Ntziachristos, Bremer, Graves et al., 2002). Die Eindringtiefe ins Gewebe und die Bildauflösung sind gesteigert, weil durch die verschiedenen Aufnahmen aus mehreren Projektionswinkeln das Signalrauschverhältnis reduziert wird. So besteht auch die Möglichkeit der Quantifizierung der Fluoreszenzstärke. Das Verfahren der NIR-Bildgebung ist aufgrund der eingeschränkten Durchdringungstiefe des Gewebes sicher besonders für oberflächennahe Organe und Körperteile wie die weibliche Brust oder die Haut geeignet, aber auch für eine intraoperative Anwendung denkbar.

Klinische Anwendungsmöglichkeiten der molekularen Fluoreszenzbildgebung mit Nahinfrarotlicht werden inzwischen zunehmend entwickelt. Sie bieten sich beispielsweise auch im endoskopischen Bereich. Von Funovics und Mitarbeitern wurde 2003 ein Zweikanal-NIR-Endoskop für die Bildgebung an Mäusen entwickelt. Das Endoskop arbeitet mit sichtbarem Licht und zwei Fluoreszenzkanälen. So ist sowohl eine normale Betrachtung der anatomischen Verhältnisse im endoskopierte Bereich, als auch über die Fluoreszenzkanäle eine Beurteilung von Enzymaktivitäten und der Durchblutung möglich (Funovics et al., 2003).

Eine weitere interessante Anwendung der NIR-Bildgebung ist es, intraoperativ Aussagen über die Funktion und Anatomie von Geweben zu erhalten. Mit einem von Nakayama vorgestellten Imaging-System ist es möglich, intraoperativ zwei verschiedene Fluorochrome zu detektieren. In einer Operation am Herzen einer Ratte wurden mit diesem System Blutgefäße und Gebiete relativer Ischämie dargestellt (Nakayama et al., 2002).

Diese Anwendungen der NIR-Bildgebung bieten die äußerst interessante Möglichkeit und Chance intraoperativ oder während eines diagnostischen Eingriffs direkt *in vivo* Erkenntnisse über die Funktion, sowie bestimmte Eigenschaften des untersuchten Gewebes zu gewinnen.

1.3. CyDyes™ (monoreaktive NHS-Ester)

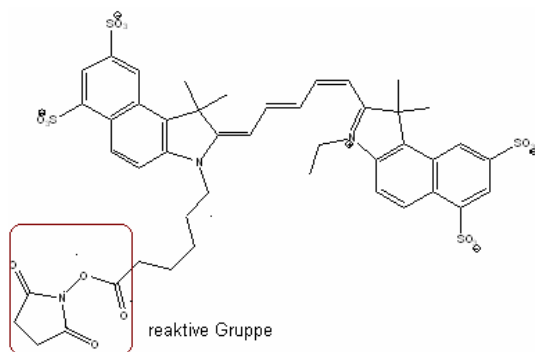


Abb. 1.4: Strukturformel des CyDyes Cy5.5-NHS-Esters, Absorptionswellenlänge 674 nm, Emissionswellenlänge 689 nm.

Die in dieser Arbeit verwendeten CyDye-NHS-Ester sind Fluoreszenzfarbstoffe, die in der biomedizinischen Forschung weit verbreitet sind. Die Strukturformel von Cy5.5-NHS ist in Abb. 1.4 gezeigt. CyDyes bieten gegenüber anderen Fluoreszenzfarbstoffen mehrere Vorteile. Zum einen fluoreszieren sie im nahinfraroten Bereich des Spektrums, wodurch sie besonders für die Detektion mit CCD-Kameras und für die *in vivo* Bildgebung geeignet sind. Wie auch in Abb. 1.2 zu sehen ist, weisen Hämoglobin und Wasser, als die Stoffe, die das meiste sichtbare und infrarote Licht im Gewebe absorbieren, im NIR-Bereich (650-900 nm) den niedrigsten Absorptionskoeffizienten auf (Weissleder, 2001).

Zum anderen zeichnen sich CyDyes durch eine große Fluoreszenzintensität (*brightness*) aus, diese nimmt auch bei einer größeren Anzahl von Fluorochromen pro Molekül nur in geringem Maß durch Prozesse der Fluoreszenzlöschung (*quenching*) ab.

Ferner sind sie wasserlöslich, was einen weiteren Vorteil gegenüber anderen Fluoreszenzfarbstoffen darstellt. Anders als Fluorescein, das über lange Zeit bevorzugt zur Fluoreszenzmarkierung eingesetzt wurde, sind die CyDyes photostabil und pH-Änderungen gegenüber unempfindlich (Mujumdar, 1993). Die Fluoreszenz von Fluorescein nimmt jedoch mit zunehmendem Protonierungsgrad schnell ab.

Eine weitere bekannte, in der Fluoreszenzbildgebung häufig eingesetzte Substanz ist das GFP (*green fluorescent protein*). GFP ist ein natürlich vorhandenes Protein und fluoresziert im grünen Bereich des Spektrums. GFP wird von verschiedenen Bakterien und der Qualle *Aequorea victoria* gebildet und sorgt bei diesen Organismen für Biolumineszenz; darunter versteht man chemische Reaktionen in lebenden Organismen, bei denen Licht erzeugt wird (Mujumdar, 1993).

Das GFP-Gen ist seit einiger Zeit identifiziert und es ist möglich, das Gen des GFP mit dem Gen eines Zielproteins zu verbinden. Bei Expression des Zielproteins ist das Protein dann mit dem GFP verbunden, so dass die Expression des Zielproteins sehr effektiv lokalisiert werden kann. Es wurden Mutanten des GFP mit verschiedenen Farben, Anregungswellenlängen, und stärkerer Fluoreszenz entwickelt (Heim, 1995). GFP selbst fluoresziert im Bereich zwischen 500 und 560 nm und somit nicht im NIR-Bereich (650-900 nm). Daher ist GFP im Vergleich zu den CyDyes für *in vivo* Fluoreszenzbildgebung weniger geeignet.

Die reaktive Gruppe der CyDyes ist ein *N*-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester). Dieser reagiert mit den primären Aminogruppen von Lysinresten oder der *N*-terminalen Aminogruppe des Proteins unter Bildung einer Peptidbindung. Das Reaktionsschema ist in Abb. 1.5 gezeigt. Eine Konkurrenzreaktion zu der beschriebenen Reaktion ist die Hydrolyse des NHS-Esters. Der hier verwendete CyDye Cy5.5 ist ein monoreaktiver Ester, d.h. er hat nur eine reaktive Gruppe und kann deshalb nur unter Bildung *einer* Peptidbindung reagieren. Cy5.5 ist

mit einer Absorptionswellenlänge von 674 nm und einer Emissionswellenlänge von 689 nm besonders gut für die Bildgebung mit Nahinfrarotlicht geeignet.

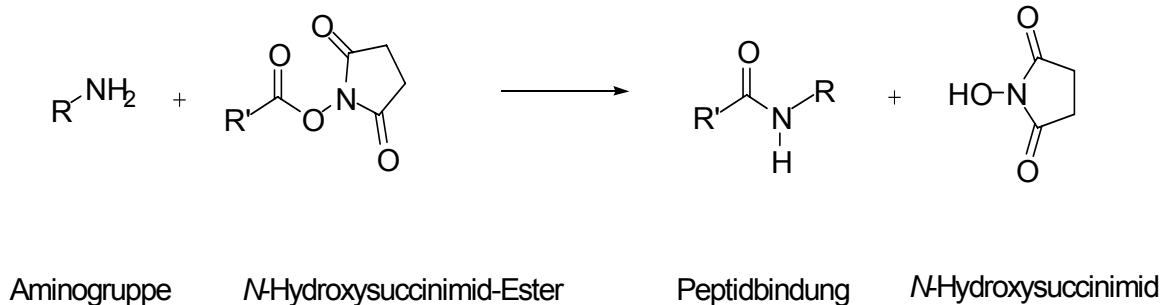


Abb. 1.5: Reaktionsschema der NHS-Ester-Reaktion

1.4. Der CCK-Rezeptor - Vorkommen und Funktion

Gastrin und Cholecystokinin sind gastrointestinale Peptide mit verschiedenen regulatorischen Funktionen im menschlichen Organismus. Sie fungieren als Regulationspeptide im Gastrointestinaltrakt, speziell auf der Ebene von Magen, Pankreas und Gallenblase und auch als Neurotransmitter im Gehirn. Die physiologischen Wirkungen von Gastrin und Cholecystokinin bestehen unter anderem in der Stimulation der Salzsäuresekretion der Belegzellen, der Stimulation der Freisetzung von Pepsinogen und der Verstärkung der Magenperistaltik. Des Weiteren stimulieren sie die Sekretion der Azinuszellen und fördern die Freisetzung von Pankreashormonen. Weiter erhöhen diese Peptide die Gallensaftsekretion und die Kontraktilität der Gallenblase.

Ferner stimulieren sie als physiologische Wachstumsfaktoren das Wachstum von Epithelien des Magens und des Duodenums (Hakanson, 1991, Johnson, 1976), aber auch das durch sie vermittelte Wachstum verschiedener Neoplasmen wird diskutiert (Rehfeld, van Solinge, 1994; Reubi, Schaer, Waser, 1997).

Diese Wirkungen werden durch zwei verschiedene Rezeptortypen vermittelt. Sie werden als CCK1- und CCK2- Rezeptor bezeichnet. Der CCK1-Rezeptor

hat eine niedrige, der CCK2-Rezeptor eine hohe Affinität zu Gastrin. Beide Rezeptoren stellen G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen dar. Die Signaltransduktion erfolgt über den Phosphatidylinositolweg.

Die Bindung des Gastrins bzw. CCKs an eine der sieben extrazellulär gelegenen Rezeptordomänen führt zur Aktivierung eines G-Proteins (G_q), dessen membrangebundene α -Untereinheit dann im Komplex mit GTP entlang der Plasmamembran diffundiert und das membrangebundene Enzym Phospholipase C aktiviert. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2), einem Phospholipid der inneren Zellmembran zu Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). Dabei findet eine Hydrolyse von GTP zu GDP statt. IP_3 setzt Calciumionen aus intrazellulären Speichern frei und löst so verschiedene Vorgänge wie Glucosemobilisierung und Muskelkontraktionen aus, DAG stimuliert die Phosphokinase C, diese phosphoryliert ihrerseits verschiedene Enzyme, was letztendlich zu den oben beschriebenen Wirkungen von Gastrin und Cholecystokinin führt, vgl. Abb. 1.6. (Voet, 2002).

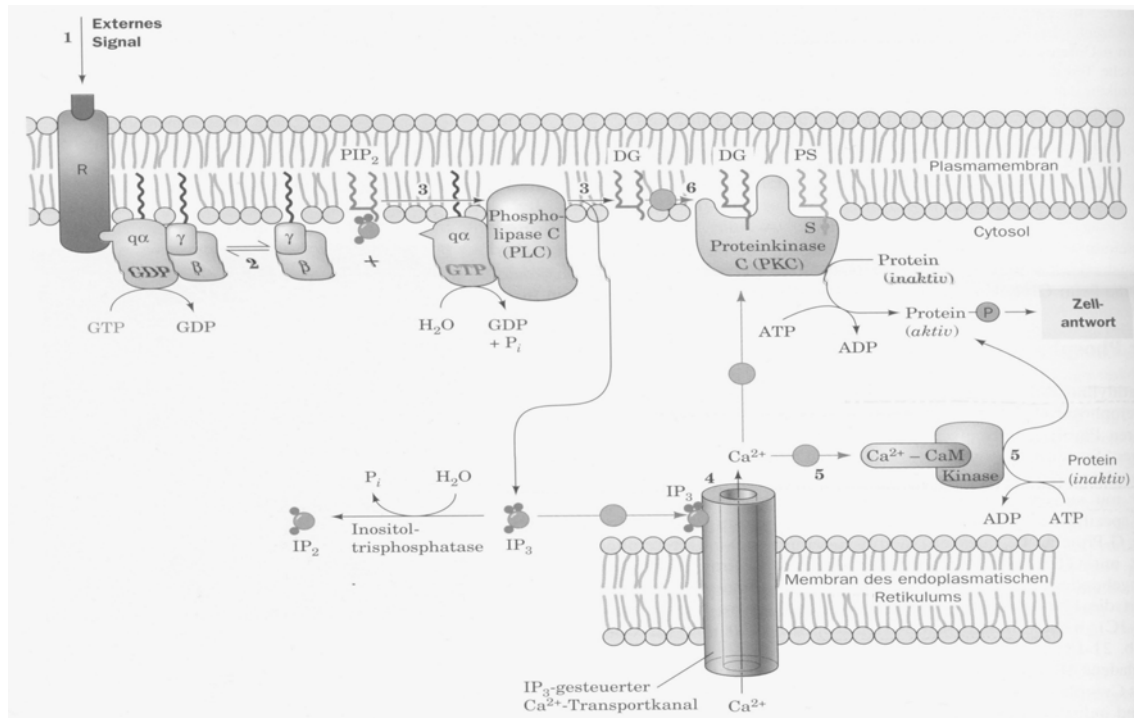


Abb. 1.6: Schematische Darstellung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors und Darstellung des *second messenger pathways* über Phosphatidylinositolphosphat (Voet, 2002).

CCK1-Rezeptoren finden sich in der Gallenblase, in der Bauchspeicheldrüse und im Gehirn, CCK2-Rezeptoren sind physiologisch in der Mukosa des Magen-Darm-Trakts und im Gehirn vertreten.

Aber auch in verschiedenen Tumoren werden CCK-Rezeptoren exprimiert, wobei CCK1-Rezeptoren seltener als CCK2-Tumoren in humanen Tumoren zu finden sind. Diese unphysiologische Expression von Rezeptoren in Tumorgewebe kann in Bildgebungsverfahren dazu genutzt werden diese Tumore darzustellen und zu detektieren. In verschiedenen Arbeitsgruppen, vor allem aber in der Gruppe um *Reubi* und *Schaer*, wurden die unterschiedlichsten Tumore auf ihre CCK-Rezeptorexpression untersucht.

Signifikante Rezeptorkonzentrationen von CCK1-Rezeptoren sind in gastroenteropankreatischen Tumoren (30%), Meningeomen und Neuroblastomen nachzuweisen.

CCK2-Rezeptoren finden sich in mehr als 90 % aller medullären Schilddrüsenkarzinomen, während in nicht-medullären Schilddrüsenkarzinomen und gesundem Schilddrüsenengewebe keine CCK2-Rezeptoren nachgewiesen werden konnten (Reubi, Waser, 1996). Auch in kleinzelligen Bronchialkarzinomen findet man in ungefähr 60 % der Tumore eine Expression von CCK2-Rezeptoren, in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen jedoch nur in 7 % der Fälle (Matsumori et al., 1995; Reubi, Schaer, Waser, 1997). Weiterhin finden sich eine hohe Anzahl dieser Rezeptoren in Astrozytomen und ovariellen Stromatumoren; in gastroenteropankreatischen Tumoren, Meningiomen, endometrialen und ovariellen Adenokarzinomen, sowie in bestimmten Mammakarzinomen und einigen Stammzelltumoren werden CCK2-Rezeptoren nur unregelmäßig exprimiert, siehe dazu Tabelle 1.

Es ist momentan Gegenstand der Forschung, ob bei diesen Tumoren Gastrin ebenfalls als Wachstumsfaktor anzusehen ist. Beim Barrett-Ösophagus ist ebenfalls der CCK2-Rezeptor exprimiert und verhindert dort scheinbar die Apoptose dysplastischer Zellen (Harris et al., 2004).

1. Einleitung

Tumorart	CCK B- Rezeptoren	CCK A-Rezeptoren
<i>Neuroendokrine Tumoren</i>		
Medulläres Schilddrüsenkarzinom	22 von 24 (92 %)	2 von 24 (8 %)
Kleinzelliges Bronchialkarzinom	8 von 14 (57 %)	0 von 14 (0 %)
Gastroenteropankreatische Tumore	7 von 32 (22 %)	12 von 32 (38 %)
Neuroblastome	1 von 16 (6 %)	3 von 16 (19 %)
<i>Tumore des ZNS</i>		
Astrozytome	11 von 17 (65%)	0 von 17 (0 %)
Meningiome	1 von 27 (4 %)	8 von 27 (30 %)
<i>Tumore des reproduktiven Systems</i>		
Mammakarzinome	5 von 65 (8 %)	2 von 65 (2%)
Endometriumskarzinom	2 von 16 (13 %)	0 von 16 (0 %)
<i>Ovarialkarzinome</i>		
Epitheliale Tumore	4 von 28 (14 %)	0 von 28 (0 %)
Stromatumore	3 von 3 (100 %)	0 von 3 (0 %)
Prostatakarzinome	1 von 15 (7 %)	0 von 15 (0 %)
Nicht-Kleinzelliges Bronchialkarzinom	1 von 14 (7 %)	0 von 14 (0 %)
<i>Humane Stammzelltumore</i>		
Wilms Tumore	2 von 4 (50 %)	0 von 4 (0 %)
Rhabdomyosarkome	1 von 5 (20 %)	0 von 5 (0 %)
Leiomyosarkome	5 von 10 (50 %)	2 von 10 (20 %)
Medulloblastome	1 von 11 (9 %)	1 von 11 (9 %)
Neuroblastome	1 von 10 (10 %)	1 von 10 (10 %)

Tabelle 1.1: CCK-Rezeptorinzidenz in Tumoren. (Reubi, Schaer, Waser, 1997; Schaer, Reubi, 1999)

1.5. CCK2-Rezeptor : seine Liganden zur Darstellung CCK2positiven Gewebes in szintigraphischen Verfahren

Vor allem die hohe CCK2-Rezeptorexpression im medullären Schilddrüsenkarzinom führte zu der Annahme, dass dieser Rezeptor analog zur Somatostatinrezeptorszintigraphie (SRS), zur Darstellung in der szintigraphischen Bildgebung geeignet ist (Behr et al., 1999).

Die auf Peptiden basierende Bildgebung hat den Vorteil, dass Peptide als Moleküle mit geringem Molekulargewicht leicht in alle Gewebe penetrieren können. Die dadurch resultierende schnelle Clearance aus dem Blut führt bereits kurze Zeit nach Peptidgabe zu guten Signalrauschverhältnissen. Die Blut-Hirn-Schranke stellt jedoch aufgrund der Hydrophilie der Peptide eine Barriere dar (Behr et al., 2001; Gotthardt, Boermann, 2004).

Es wurden verschiedene Rezeptorliganden der Gastrin und CCK-Familie in Bezug auf ihre Bindungsaffinitäten zum CCK2-Rezeptor, ihre Serumstabilität und die Biodistribution getestet. Alle Liganden verfügten am C-terminalen Ende über die Tetrapeptidsequenz Trp-Met-Asp-Phe-NH₂. Von dieser Sequenz ist bekannt, dass sie für die Rezeptorbindung essentiell ist (Behr et al., 1999).

Die getesteten Liganden waren im Serum für mehrere Stunden stabil, wobei die Peptide, an deren N-terminalem Ende eine D-Aminosäure oder ein Pyroglutaminsäure-Rest (p-Glu) vorhanden war, signifikant längere Halbwertszeiten zu verzeichnen hatten. Sulfatierte und nicht sulfatierte CCK-Liganden schieden aufgrund einer ähnlichen Affinität zu beiden Rezeptortypen, und somit fehlender Selektivität, für die Darstellung des CCK2-Rezeptors aus. Nicht sulfatierte Gastrine zeigten die günstigsten Eigenschaften in Bezug auf Tumoraaffinität und Selektivität zum CCK2-Rezeptor (Behr et al., 1999).

Für das Gastrinanalogon D-Glu¹-Minigastrin, ein Peptid mit einer Kettenlänge von dreizehn Aminosäuren, wurde erfolgreich ein DTPA-(Diethylentriamin-pentaacetat)-Derivat entwickelt. DTPA ist ein Komplexligand für radioaktive

Metallionen, wie z. B. ^{111}In , und macht eine einfache Radiomarkierung möglich. Außerdem ist es von Vorteil, dass DTPA nach Internalisierung in die Zelle nur eine geringe Externalisierung zeigt und sich dort anreichert. Diese Tatsache bietet Potential für eine therapeutische Anwendung von DTPA-D-Glu¹-Minigastrin.

Eine erste klinische Studie zeigte, dass ^{111}In -DTPA-D-Glu¹-Minigastrin mit einer im Vergleich zu PET, CT und SRS höheren Sensitivität metastasierte medulläre Schilddrüsenkarzinome aufzeigen kann (Gotthardt, Battmann et al., 2003).

Eine andere Studie, in der die Gastrin-Rezeptor-Szintigraphie (GRS) mit der SRS verglichen wurde, zeigte, dass in etwa der Hälfte der Patienten, in der in der SRS keine Aufnahme in den Tumor zu verzeichnen war, die Gastrin-Rezeptor-Szintigraphie positiv ausfiel. Darüber hinaus war in etwa 20 % der Patienten eine höhere Aufnahme von Gastrin im Vergleich zu Octreotid in die Tumore zu beobachten (Gotthardt, Grass et al., 2003; Gotthardt, Boermann, 2004).

1.6. Der ErbB/Her2-Rezeptor: sein Vorkommen, seine Funktion

Der ErbB/Her2neu-Rezeptor gehört zur Familie der Wachstumsfaktor-bindenden Rezeptoren, zu denen auch der EGF (*epidermal growth factor*)-Rezeptor gehört. Zur Familie der ErbB/Her-Rezeptoren gehören vier verschiedene Rezeptoren. ErbB/Her1-, ErbB/Her2-, ErbB/Her3-, und der ErbB/Her4- Rezeptor.

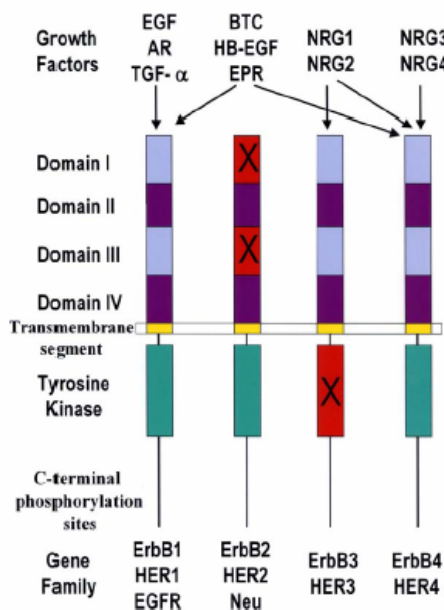


Abb. 1.7: Die ErbB-Genfamilie und die Rezeptorliganden. Die inaktive Liganden-bindungsdomäne des ErbB2-Rezeptors und die inaktive Kinasedomäne des ErbB3-Rezeptors sind durch ein X gekennzeichnet (Roskoski, 2004).

Die ErbB/Her-Rezeptoren sind Proteintyrosinkinasen, welche eine Schlüsselrolle in der Zellbiologie spielen. Sie regulieren so wichtige Prozesse wie Apoptose, Zellzyklus, Zelldifferenzierung und Entwicklung, Immunantwort und auch die Transkription (Roskoski, 2004). Dysregulierte Proteinkinasen findet man bei verschiedenen Krankheiten, wie z.B. in Karzinomen, Diabetes, sowie in kardiovaskulären, entzündlichen und autoimmunbedingten Krankheiten.

Rezeptortyrosinkinasen enthalten typischerweise nur ein Transmembransegment und sind im nicht bindenden Zustand Monomere. Die Bindung eines

entsprechenden Liganden führt dazu, dass zwei monomere Rezeptoren ein Dimer ausbilden, es kann sich hierbei um Homo- oder Heterodimerisierung handeln. Die Dimerisierung bringt die intrazellulären Rezeptordomänen in einer Weise zusammen, die diese aktiviert. Die Aktivierung wird durch wechselseitige Kreuzphosphorylierung von Tyrosinresten in den Tyrosinkinasedomänen (Autophosphorylierung) vervollständigt.

Die proliferativen Signale werden über einen Signaltransduktionsweg vermittelt, welcher Adapterproteine wie Grb2 und SH2- Domänen, sowie Phospholipase C-γ (ErbB1), Phosphokinase C-, Ras-, Raf-, MEK-, MAPK- und PI₃- abhängige Signalwege einbezieht (ErbB3, ErbB4). Diese Signaltransduktionswege beeinflussen direkt und indirekt die Zellzykluskontrolle und Transkriptionsregulation, z.B. durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie fos, jun und myc, siehe dazu auch Abb. 1.8.

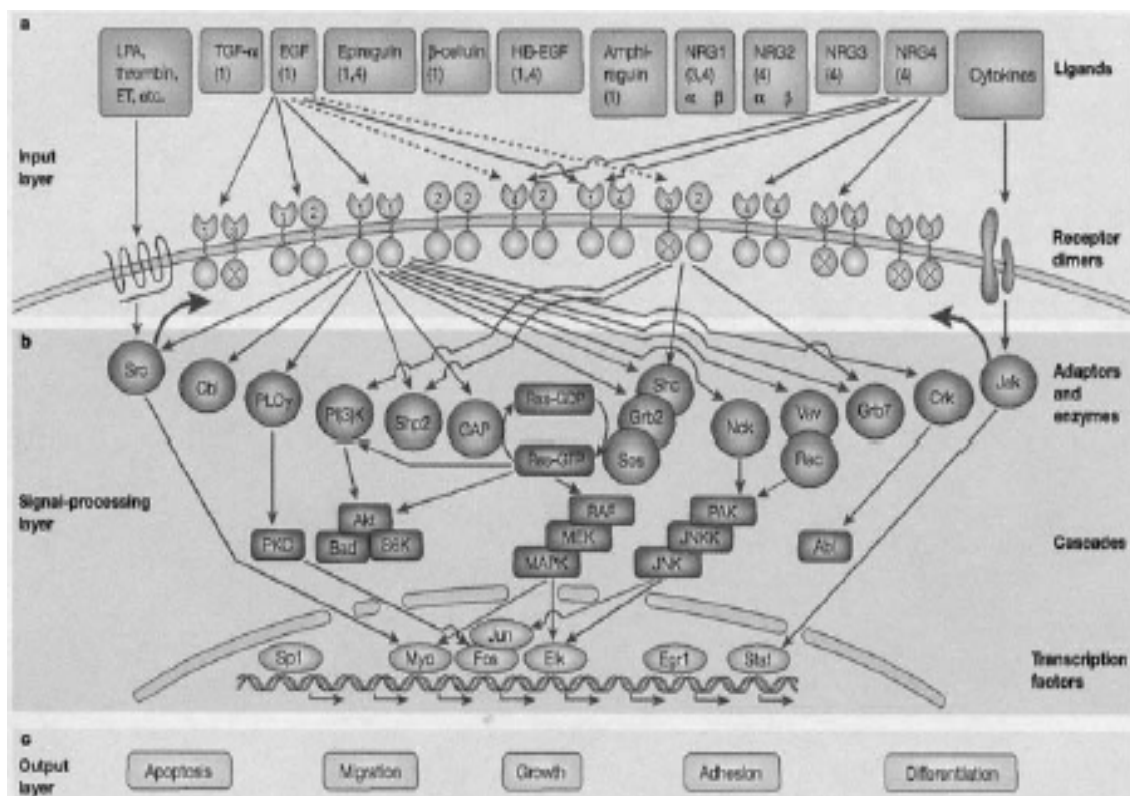


Abb. 1.8: Wege der Signaltransduktion der ErbB/Her-Rezeptor-Familie (Yarden, 2001).

Die erste von Stanley Cohen beschriebene Proteintyrosinkinase ist der EGF-Rezeptor, der dem ErbB/Her1-Rezeptor entspricht. Dieser Rezeptor ist in Blasen-, Brust-, Kopf-, Hals-, Nieren- und Prostata Tumoren, sowie in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen überexprimiert (Salomon et al., 1995).

Der zweite Rezeptor der Familie der ErbB-Rezeptoren ist der ErbB/Her2-Rezeptor. Für ErbB/Her2-Rezeptor-Homodimere ist bislang kein spezifischer Ligand bekannt. Er bildet jedoch Heterodimere mit allen anderen Rezeptoren dieser Familie; diese Heterodimere können wiederum Wachstumsfaktoren binden, welche ein potenteres Signal als die Homodimere von ErbB1 und ErbB4 allein bewirken. Die Heterodimere des ErbB/Her2-Rezeptors führen weiter zu einer verlangsamten Dissoziation des Liganden und einer Lockerung der Spezifität des Liganden zu seinem Rezeptor. Die Rezeptorendozytose, die zu einer Beendigung der Signaltransduktion führt, verlangsamt sich und das Rezeptorrecycling ist beschleunigt. Dies alles führt zu einem verlängerten und potenteren Signal, siehe dazu auch Abb. 1.9.

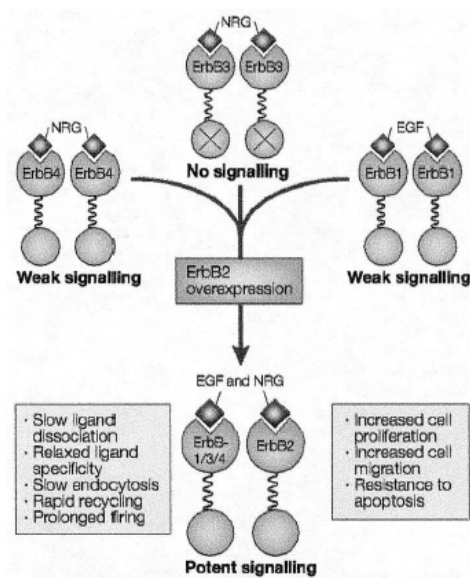


Abb. 1.9: Heterodimere mit ErbB/Her2neu (Yarden, 2001).

Anders als bei den anderen ErbB-Rezeptoren kann eine Überexpression von ErbB/Her2 eine maligne Transformation von Geweben zur Folge haben, ohne dass gleichzeitig ein Wachstumsfaktor exprimiert wird. Dies lässt vermuten, dass ErbB/Her2 eine hohe konstitutive Aktivität besitzt oder liganden-unabhängig dimerisiert, so dass eine Expression oberhalb eines gewissen Levels Tumorwachstum fördert (Yarden, 2001).

Eine Überexpression von ErbB/Her2 ist in 20 - 25 % aller invasiven Mammakarzinome zu finden und ist assoziiert mit einer kürzeren krankheitsfreien Überlebenszeit bzw. mit einer schlechteren Prognose (Slamon, 1987). Zu Grunde liegt eine Amplifikation im Wildtyp Her2-Gen. Auch von Metastasen dieser Tumore sind ErbB2-Rezeptoren exprimiert (Niehans, 1993).

Ferner ist eine Überexpression von ErbB/Her2-Rezeptoren bei Ovarialkarzinomen (Hellström, 2001), Zervix-, Colon-, Pankreas-, Ösophagus-, Lungen- und endometrialen Karzinomen zu finden (Salomon, 1995; Blume-Jensen, 2001). In Prostatakarzinomen sind ErbB/Her2-Rezeptoren nur unregelmäßig exprimiert (Lara, 2002).

Der ErbB3-Rezeptor bildet ebenso wie der ErbB2-Rezeptor Heterodimere mit anderen ErbB-Rezeptoren. Dieser ErbB3-Rezeptor hat selbst keine Kinaseaktivität und Kreuzphosphorylierung durch sein Partnermonomer ist zwingend notwendig für die Signaltransduktion. ErbB3 ist in Mamma-, Colon-, Prostata- und Magenkarzinomen exprimiert. Die Wirkung von ErbB2 und ErbB3-Rezeptoren als Heterodimere macht sie zu Modulatoren der Zellantwort (Alimandi, 1995). Eine ErbB4-Expression findet sich in Mammakarzinomen und Granulosazelltumoren des Ovars.

1.7. Herceptin® - ein Antikörper gegen den ErbB/Her2neu-Rezeptor und seine Rolle in der Therapie des Mammakarzinoms

Herceptin® (Trastuzumab) ist ein monoklonaler humanisierter Mäuseantikörper gegen die Domäne IV des extrazellulären Anteils des ErbB/Her2-Rezeptors. Dieser Antikörper wird seit 1998 zur Behandlung von metastasierten Mammakarzinomen, die den ErbB/Her2-Rezeptor überexprimieren, eingesetzt. Wie bereits an anderer Stelle beschrieben wurde, exprimieren 20-25 % aller Mammakarzinome den ErbB/Her2neu-Rezeptor und dieses Rezeptorvorkommen ist mit einer schlechteren Prognose für die Patientin verbunden (Slamon, Clark et al., 1987).

Die Ermittlung des Rezeptorstatus oder der Genamplifikation im Her2neu-Gen erfolgt mittels immunhistochemischer Färbung (IHC) oder Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH). Die FISH ist aufgrund einer höheren Sensitivität, Spezifität und Objektivität der Methode besser als IHC geeignet ist, die Patientinnen ausfindig zu machen, die von einer Trastuzumab-Therapie profitieren (Fornier, 2002; Nahta, 2003); dies ist bei einem Expressionslevel von +2 und +3 der Fall.

Ein weiterer prognostischer Marker sind hohe Werte von Her2-ECD (*extracellular domain*), einem Her2-Rezeptorfragment, im Serum, sie gehen mit einer schlechteren Prognose und schlechteren Ansprechraten auf eine hormonelle Therapie oder Chemotherapie einher (Colomer, 2000; Yamauchi, 1997). Her2-ECD (95 kD) entsteht durch eine langsame proteolytische Spaltung des Her2-Rezeptors (185 kD) und erhöht die Kinaseaktivität und die transformierende Effizienz des Rezeptorrestes (Segatto, 1988; Di Fiore, 1987). Herceptin® scheint die Spaltung des ErbB/Her2-Rezeptors und die Freisetzung des ECD-Fragments zu inhibieren und so zur Antitumorwirkung beizutragen (Molina, 2001). Als weitere Wirkmechanismen von Trastuzumab wird die Rezeptorinternalisierung und Degradation vermutet, dies unterbricht die Rezeptordimerisierung und die Signaltransduktion. Ferner soll Herceptin® einen Arrest in der G₁-Phase des Zellzyklus bewirken und Apoptose induzieren sowie

Neoangiogenese supprimieren. Auch wird vermutet, dass der Antikörper durch eine Immunantwort natürliche Killerzellen aktiviert (Sarup, 1991; Yakes, 2002; Izumi, 2002).

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Herceptin® als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapeutika wie Anthracyclinen und Cyclophosphamid, sowie Paclitaxel, Doxetaxel, Cisplatin und Vinorelbin die Zeit bis zu einem Fortschreiten der Erkrankung verlängerte, partielle Remissionen bewirkte und die Ansprechraten auf die Chemotherapie erhöhte (Vogel, 2003). Ferner verbesserte Herceptin® die Überlebensrate im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie (Slamon, Leyland-Jones et al., 2001). Die Ansprechraten auf die Antikörpertherapie lagen in ersten klinischen Studien bei bis zu 35 %. Jedoch wurde bei der kombinierten Anwendung von Trastuzumab mit Anthracyclinen ein vermehrtes Auftreten von Herzinsuffizienzen (NYHA III, IV) beobachtet, die jedoch nach Absetzen von Trastuzumab zum größten Teil reversibel waren. Die Kardiotoxizität macht es schwierig, Herceptin® in adjuvante Therapieregime einzubeziehen, da diese häufig auf Anthracyclinen aufbauen (Vogel, 2003).

Abgesehen von dem Risiko der Kardiotoxizität wird Herceptin® gut vertragen, beobachtet werden lediglich grippeähnliche Symptome wie Fieber, Übelkeit, Durchfall oder Kopfschmerzen, die sich nach wiederholter Gabe häufig bessern.

In der HERA Studie wird derzeit der Nutzen von Trastuzumab in der adjuvanten Therapie des ErbB2 positiven Mammakarzinoms untersucht. Erste Auswertungen zeigen, dass durch Herceptin® das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben signifikant verbessert werden kann. Auch das Risiko der Kardiotoxizität scheint auch bei längerer Nachbeobachtung während der Studie gering zu sein (Smith I, et al. 2007; Piccart-Gebhart, et al. 2005)

1.8. Ziele der Arbeit

In der Einleitung wurde neben den bereits etablierten Bildgebungsverfahren CT und MRT ein neues Bildgebungsverfahren vorgestellt: die molekulare *in vivo* Fluoreszenzbildgebung mit Nahinfrarotlicht.

Aufgabe dieser Arbeit war es, mit Hilfe dieser Methode CCK2- und ErbB/Her2-Rezeptoren darzustellen.

Dieses Projekt setzte sich wie folgt zusammen:

- Fluoreszenzmarkierung geeigneter Liganden
- Bestimmung der Rezeptoraffinität dieser Liganden
- Beobachtung der Rezeptorbindung *in vitro* mittels konfokaler Mikroskopie
- Darstellung von CCK2- bzw. ErbB/Her2-Rezeptor exprimierenden Tumoren im Tiermodell *in vivo* mittels *Fluorescence reflectance imaging* (FRI)

Als Ligand an den CCK2-Rezeptor wurde D-Glu¹-Minigastrin verwendet. Zur Darstellung des ErbB/Her2-Rezeptors wurden Herceptin[®] und die F(ab') und F(ab')₂-Fragmente dieses Antikörpers als Liganden ausgetestet.

2. Materialien und Methoden

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von Sigma, Deisenhofen, Merck, Darmstadt oder Fluka, Buchs (CH) bezogen.

2.1. Materialien

2.1.1. Allgemeine Laborgeräte

Analysenwaage	KERN 770	DKD–Labor, Balingen
Bohrloch	Nuclear Spectrometer LB 2040	Berthold, Bad Wildbach
Heizblock	MR 3001 K	Heidolph, Kelkheim
HPLC System	UV-vis-Detector: HPLC 535 Pumpe: System 525	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
Lyophilisator	ALPHA 1-2	Christ, Osterode
pH – Meter	Delta 350	Mettler, Gießen
Pipettierhilfen	Pipetus akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
	Finnpipette	FinntipsLabsystems, Dreieich

2. Materialien und Methoden

Vortexer	Reax 2000	Heidolph, Kelkheim
	MS 2 Minishaker	
	IKA-Vibrax VXR	IKA®, Staufen
	3006	GFL, Burgwedel
Wärmeschränk	Wärmeschränk	Memmert, Schwabach
Zentrifugen	Megafuge 2.0	Heraeus , Karlsruhe

Tabelle 2.1: Allgemeine Laborgeräte

2.1.2. Zellkulturgeräte

Brutschrank	Hera safe	Heraeus, Karlsruhe
Sterile Werkbank	Hera cell	Heraeus, Karlsruhe
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech, Karlsruhe
Mikroskop	Olympus	Olympus, Hamburg

Tabelle 2.2: Zellkulturgeräte

2.1.3. Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf, Hambur
Pipettenspitzen µl		Finntips Labsystems, Dreieich
PS-Röhrchen	3 ml 5 ml	Greiner Frickenhausen
PP-Röhrchen	15 ml	Greiner, Frickenhausen
Spritzen	Injekt Luer BD Plastipack™ 1 ml	Braun, Melsungen BD, Madrid, Spanien
Injektionskanülen	BD Microlance	Braun, Melsungen
Halbmikroküvetten	Plastibrand®, 1,5 ml	Brand, Wertheim
30 kD Filter	Amicon Ultra 30k	Amersham Biosciences, Freiburg
C ₁₈ Filter	Sep-Pak® Cartridges C18	Waters Corporation, Milford, USA
PD 10 – Säule	Sephadex G-25 M	Amersham Biosciences, Freiburg

Tabelle 2.3: Allgemeine Verbrauchsmaterialien

2.1.4. Zellkulturmaterialien

Gewebekulturflaschen	250 ml, steril	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturplatten		Greiner, Frickenhausen
Pipetten mit Spitze	50 ml, steril	Greiner, Frickenhausen
	25 ml	
	10 ml	
	5 ml	
	2 ml	
Pipettierhilfe	Pipetus akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Neubauer Zählkammer		Marienfeld, Königshofen

Tabelle 2.4: Zellkulturmaterialien

2.1.5. Zellkulturmedien und Zusätze

BSA	Fluka, Buchs, Schweiz
DMEM	PAA Laboratories, Linz, Austria
IMDM	PAA Laboratories, Linz, Austria
FCS	PAA Laboratories, Linz, Austria
Gentamycin	PAA Laboratories, Linz, Austria
L-Glutamin	PAA Laboratories, Linz, Austria
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories, Linz, Austria
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Linz, Austria

Tabelle 2.5: Zellkulturmedien und Zusätze

2.1.6. Tierversuche

Nacktmäuse	Harlan athymic mice
Narkosemittel	Ketanest, Rompun

Tabelle 2.6: Tierversuche

2.1.7. Spezielle Analysengeräte

Gamma Counter	Cobra™ II Auto Gamma	Packard, Meridien, USA
---------------	----------------------	------------------------

CCD – System:

CCD Kamera	dual mode cooled CCD camera C4880	Hamamatsu Photonics, Herrsching
Lichtquelle	CF1000	Illumination technologies, Inc., New York, USA
Kühlung	F200	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Black Box		Unit one electronics, Karlsruhe
Anregungsfilter	HQ 650/45 , 25 mm	AHF Analysentechnik AG, Tübingen
Emissionsbandpassfilter	Sperrfilter, HQ 710/50 Cy5.5, 50 mm	AHF Analysentechnik AG, Tübingen

Konfokales Mikroskop	LSM 510	Zeiss, Jena
	Plan-Apochromat 63x/1.4 oil lens	

2. Materialien und Methoden

UV-Vis Spectrometer	Ultrospec 1000	Amersham Pharmacia Biotech, Frankfurt
HPLC Säulen	BioSelect	Bio Rad, München
	Nucleosil 120-5 C ₁₈	Machery Nagel (MN), Düren

Tabelle 2.7: Spezielle Analysengeräte

2.1.8. Spezielle Chemikalien

Herceptin® Trastuzumab	Roche, Basel
Cy TM 5.5 Mono NHS Ester	Amersham Biosciences, Freiburg
D-Glu ¹ -Minigastrin	Genosys, Cambridge, UK
Biorad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Immobilized Pepsin	Pierce, Rockford, USA

Tabelle 2.8: Spezielle Chemikalien

2.1.9. Computerprogramme

Windows XP	Microsoft
Word 2000	Microsoft
Excel	Microsoft
Wasabi	Hamamatzu Photonics
Graph Pad Prism	Graph Pad
Kroma 3000	Kroma
Galaxie	Galaxie
Adobe Photoshop Album 2.0 Starter edition	Adobe
Corel draw 10	Corel Photo Paint 10 Corel

Tabelle 2.9: Computerprogramme

2.2. Methoden

2.2.1. Synthese von Cy5.5-Minigastrin

Cy5.5MonoNHS-Ester (1 mg, 886 nmol, 1 eq.) wird in 0,1 M Natriumhydrogencarbonatpuffer (pH=9,5) in einem lichtgeschützten Reaktionsgefäß gelöst, daraufhin wird sofort D-Glu¹-Minigastrin (2,15 mg, 1329 nmol, 1,5 eq.) zugefügt. Darüber hinaus noch HOBt (0,2 mg, 1329 nmol, 1,5 eq.) hinzugefügt.

Das Reaktionsgemisch wird nun für 24 h leicht bewegt. Anschließend erfolgt eine Kontrolle des Reaktionsablaufs via HPLC (high pressure liquid chromatography). Falls noch Edukt vorhanden ist, lässt man das Gemisch zwei Tage weiter unter Kühlung reagieren (4 °C).

2.2.2. Aufreinigung von Cy5.5-Minigastrin

HPLC (high pressure liquid chromatography)

Die Auftrennung des Reaktionsgemisches erfolgt mittels HPLC nach dem Prinzip der *reversed phase chromatography*. Die Chromatographiesäule besteht aus einer apolaren stationären Phase, an der eine mobile polare Phase vorbeiströmt. Die mobile Phase besteht aus einem Lösungsmittelgemisch aus Wasser mit einem Zusatz von 0,1 % TFA (polares Lösungsmittel) und 70 % Acetonitril (apolares Lösungsmittel), das während eines Durchlaufs einem Gradienten folgend immer apolarer wird. Je apolarer ein Molekül ist, desto stärker ist die Bindung an die Chromatographiesäule, umso schlechter löst es sich in polarem Lösungsmittel und wird später von der Säule eluiert, wenn das Lösungsmittel ebenfalls apolar geworden ist. Je später die Substanz von der Säule eluiert wird, desto höher ist entsprechend seine Retentionszeit.

Im Anschluss an die Säule durchfließt das Lösungsmittelgemisch einen UV-Vis-Detektor. Die aromatischen Gruppen der Peptide absorbieren bei einer Wellenlänge von 280 nm, das Fluorochrom hingegen bei einer Wellenlänge von

674 nm. Der UV-Vis-Detektor wurde auf Zweikanaldetektion eingestellt. Das Produkt ist an zwei simultanen Absorptionspeaks bei 280 und 674 nm zu erkennen.

Cy5.5-Minigastrin wird mit Hilfe der HPLC aufgereinigt. Zur Aufreinigung werden je 150 µl Reaktionsgemisch in 150 µl 0,1 % TFA in die HPLC injiziert. Das Produkt weist eine Retentionszeit von 16-17 min auf und kann so isoliert werden. Nach jedem Lauf wird die Säule mit mindestens zwei Leerläufen gespült. Das Eluat wird mit 2-3 ml destilliertem Wasser versetzt und im Gefrierschrank vor dem Lyophilisieren eingefroren. Die Proben werden gefriergetrocknet, anschließend in etwa 200 µl Wasser gelöst und zur späteren Verwendung im Gefrierschrank aufbewahrt. Zur Überprüfung der Aufreinigung und zur Konzentrationsbestimmung wird zuvor noch ein HPLC-Lauf durchgeführt.

2.2.3. Synthese von Cy5.5-Herceptin®

Zur Synthese wird Herceptin® und CyTM5.5 Mono NHS Ester verwendet. Zunächst wird nach Beipackzettel der Firma Roche eine Infusionslösung mit der Konzentration 21 mg/ml hergestellt.

12 mg Herceptin werden in 0,05 M Natriumdihydrogenphosphatpuffer umgepuffert. Zur umgepufferten Herceptin®-Lösung wurden 0,5 mg CyTM5.5 Mono NHS Ester sowie 0,1 mg HOBt gegeben.

Das Reaktionsgemisch wird nun lichtgeschützt für 24 h leicht bewegt. Die Kontrolle des Reaktionsablaufs erfolgt nach 24 h mittels HPLC. Dabei handelt sich um eine BioSelect® Gelfiltrationssäule, diese Säule trennt nicht nach dem oben beschriebenen Prinzip der *reversed phase chromatography*, sondern nach der Größe der Moleküle. Einziges Laufmittel ist PBS (pH 7,4). Die Flussgeschwindigkeit beträgt 1 ml/min. Ein Lauf dauert 20 min. Der Antikörper absorbiert bei einer Wellenlänge von 280 nm, das Fluorochrom wie oben beschrieben bei einer Wellenlänge von 674 nm.

2.2.4. Aufreinigung von Cy5.5-Herceptin®

Die Aufreinigung des erfolgt mit einem 30 kD Millipore Membran Filter, gleichzeitige Umpufferung in PBS (pH 7,2). Dieser Filter lässt alle Moleküle, die kleiner als 30 kD sind, passieren, die größeren verbleiben im Filter.

Das Trennröhrchen wird mit Puffer aufgefüllt, der Cy5.5-Herceptins® wird hinzugegeben. Anschließend wird das Trennröhrchen 6-8mal in der Ultrazentrifuge bei 3000 Umdrehungen (1891 rcf) jeweils 10 min abzentrifugiert. Die Flüssigkeit, die den Filter passiert hat, wird nach jeder Zentrifugation verworfen und das Trennröhrchen erneut mit Puffer aufgefüllt. Dies wird so oft wiederholt bis nur noch ein Volumen von 250-500 µl im Trennröhrchen verbleibt.

Im Anschluss an die Umpufferung erfolgt eine weitere HPLC-Kontrolle zur Überprüfung der Abtrennung von ungebundenem Cy5.5 und HOBt, sowie zur Konzentrationsbestimmung.

2.2.5. Herstellung der F(ab'), F(ab')₂-Fragmente von Herceptin®

2.2.5.1. Umpufferung von Herceptin

In einem ersten Schritt werden 20 mg/ml Herceptin®, dies entspricht 960 µl der Infusionslösung der Fa. Roche, in 20 mM NaOAc-Puffer umgepuffert.

Es wird achtmal für 10-15 min bei 3000 U/min (1891 rcf) im 30 kD Zentrifugenfilter zentrifugiert. Die Unterstände werden getrennt gesammelt und im UV-Vis bei 280 nm gemessen, um einen Defekt im Filter auszuschließen. Im letzten Zentrifugationsschritt wird die Antikörperlösung auf 250 µl konzentriert, der Filter mit weiteren 250 µl Puffer gespült, die beiden Fraktionen vereint und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.5.2. Antikörperfragmentierung mit immobilized pepsin (Herst. Fa. PIERCE)

Für die Antikörperfragmentierung wird zunächst das Pepsin wie folgt vorbereitet:

250 µl des resuspendierten Pepsin-Gel-Glycerol-Gemischs werden in ein 5 ml PS-Röhrchen pipettiert und 4 ml 20 mM NaOAc-Puffer (pH 3,5) zugefügt. Anschließend wird das Gemisch 10 min stehengelassen und dann 5 min bei 3000 U/min (1891 rcf) zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und verworfen. Anschließend wird der letzte Schritt noch einmal wiederholt. Das Pepsin wird in 500 µl Puffer resuspendiert und in ein 3 ml PS-Röhrchen überführt.

Der Lösung des Antikörpers in NaOAc-Puffer (siehe 2.2.5.1) werden 500 µl 20 mM NaOAc-Puffer zugefügt. Die Antikörperlösung wird zum Pepsin zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird auf dem Schüttler für 6-7 h bei 37 °C inkubiert. Eine Inkubationskontrolle findet mittels HPLC statt. Es wird dieselbe Chromatographiesäule und Methode wie bei der oben beschriebenen Synthese von Cy5.5-Herceptin® benutzt.

Nach der Inkubationszeit wird dem Reaktionsgemisch 1,5 ml 10 mM Tris-Puffer zugefügt und das Ganze 10 min bei 3000 U/min (1891 rcf) zentrifugiert.

Der Überstand wird in ein neues 3 ml PS-Röhrchen überführt, das Pepsin wird verworfen.

2.2.5.3. Aufreinigung der F(ab')₂-Fragmente

Die Trennung der niedermolekularen Fragmente des Antikörpers von den F(ab')₂-Fragmenten erfolgt wiederum über Filtration mit dem 30 kD Zentrifugenfilter. Es wird achtmal für 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Die Unterstände werden im UV-Vis auf eventuell vorhandenes Produkt überprüft. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt werden die F(ab')₂-Fragmente mit TRIS-Puffer auf

1000 µl aufgefüllt und in zwei gleichgroße Proben geteilt. Es erfolgt ein HPLC-Lauf zur Konzentrationsbestimmung.

Eine der beiden Proben wird verwendet, um die Spaltung in F(ab')-Fragmente durchzuführen.

2.2.5.4. Spaltung der F(ab')₂-Fragmente durch Cystein•HCl

Für die Spaltung der F(ab')₂-Fragmente in F(ab')-Fragmente benötigt man einen 0,02 M Cystein-Tris-Puffer (pH 7). Die Fragmente werden mit 1000 µl dieses Puffers für etwa 3 h im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Die Inkubationskontrolle erfolgt über HPLC in gewählten zeitlichen Abständen.

Um die niedermolekularen Bruchstücke von den F(ab')-Fragmenten und das Cystein•HCl zu entfernen, wird noch einmal mit dem 30 kD Filter umgepuffert. Als Puffer wurde 0,5 M NaH₂PO₄-Puffer verwendet.

2.2.6. Synthese und Aufreinigung der Cy5.5-F(ab')₂-Fragmente von Herceptin

Zunächst werden die F(ab')₂-Fragmente in 0,05 M NaH₂PO₄-Puffer (pH 8,5) umgepuffert. 5 mg F(ab')₂-Fragmenten werden 0,07 mg Cy5.5 Mono NHS Ester und 0,1 mg HOBt zugefügt. Das Reaktionsgemisch wird lichtgeschützt für 24 h bewegt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Reaktionsfortschritt mittels einer HPLC Gelfiltrationssäule überprüft.

Die Aufreinigung erfolgt durch Filtrierung durch einen Millipore 30 kD Zentrifugenfilter. Es wurde etwa zehnmal bei 3500 U/min (1891 rcf) für 10-15 min zentrifugiert. Im Anschluss erfolgt die Konzentrationsbestimmung mittels HPLC.

2.2.7. Synthese und Aufreinigung der Cy5.5-F(ab')-Fragmente des Herceptins

Zu 3 mg F(ab')-Fragmenten, die in 0,05 M NaH₂PO₄-Puffer (pH 8,5) vorlagen, wurden 0,04 mg CyTM5.5 Mono NHS Ester und 0,1 mg HOBt zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde ebenfalls für 24 h bei Raumtemperatur bewegt.

Nach Kontrolle des Reaktionserfolgs, erfolgte die Aufreinigung mittels eines 30 kD -Zentrifugenfilters und gleichzeitiger Umpufferung in PBS (pH 7,2). Es wurde fünf bis achtmal bei 3000 U/min (1891 rcf) zentrifugiert. Anschließend wurde die Konzentration bestimmt.

2.2.8. Zellkultur

2.2.8.1. Verwendete Zelllinien

Für die Zellversuche mit Cy5.5-Minigastrin und die Tumorinduktion für die Tierversuche werden CCK2-Zellen verwendet. Diese Zellen entstammen einem Hamsterovarialtumor und überexprimieren CCK2-Rezeptoren. Als Negativkontrolle für die Tierversuche dienten CCK1-Zellen.

Für die Zellversuche zur IC₅₀ Bestimmung mit Herceptin[®] und den Herceptinfragmenten wurden SKBR3-Zellen, Mammakarzinomzellen, die den ErbB/Her2-Rezeptor überexprimieren, verwendet. Zur Tumorinduktion dienten SKOV3-Zellen, da SKBR3-Zellen für die Tumorinduktion in athymischen Mäusen ungeeignet sind (Barbacci et al., 2003). Für die konfokalen Mikroskopieversuche wurden, ebenfalls SKOV3-Zellen verwendet, dies sind Ovarialkarzinomzellen, die den ErbB/Her2-Rezeptor überexprimieren.

2.2.8.2. Zellmedien

Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Bei allen erwähnten Zelllinien handelt es sich um adhärente Zellen, die in 250 ml

Gewebekulturflaschen gehalten wurden. Zweimal wöchentlich wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Das Zellkulturmedium für die Zelllinien CCK2 und CCK1 besteht aus 500 ml DMEM angereichert mit 50 ml fetalem Kälberserum (FCS), 500 U Penicillin und 5 mg Streptomycin und 50 µg/ml Gentamycin.

Das Medium für die SKBR3/SKOV3- Zellen besteht aus 500 ml IMDM und einem Zusatz von 50 ml FCS und 10 mM L-Glutamin, sowie 500 U Penicillin und 5 mg Streptomycin.

2.2.9. Zellversuche zur IC₅₀-Bestimmung

2.2.9.1. Aussäen der Zellen in 6-Well-Platten

Für die Zellversuche zur IC₅₀-Bestimmung werden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. Die SKBR3/SKOV3 Zellen wurden im Verhältnis von 1:14, die CCK2 Zellen im Verhältnis 1:80 ausgesät. Bei täglichem Mediumwechsel sind die Wells am zweiten Tag vollständig bewachsen.

2.2.9.2. Markierung von D-Glu¹-Minigastrin mit ¹¹¹In

2 µl DTPA-D-Glu¹-Minigastrin werden zusammen mit 50 µl 0,5 M NaOAc-Puffer und 500 µCi ¹¹¹InCl₃ für eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubationszeit findet eine Qualitätskontrolle mittels Sep-Pak[®] Cartridges C18 Filter statt. Der C18 Filter wird mit je 2 ml Ethanol und NaOAc Puffer gespült. 1 µl des markierten Minigastrins wird auf den Filter gegeben und zunächst mit 2 ml Puffer, dann 2 ml Ethanol gespült. Die Spülflüssigkeit wird in zwei unterschiedlichen PS-Röhrchen aufgefangen, der Filter in ein drittes Röhrchen gegeben.

Die drei Röhren werden im Bohrloch Curiemeter gemessen und der gebundene Anteil berechnet: $(\text{Ethanolfraktion} + \text{Filterfraktion} - \text{Pufferfraktion}) / (\text{Ethanolfraktion} + \text{Filterfraktion} + \text{Pufferfraktion})$.

Anschließend wird die Menge an ^{111}In -markiertem Minigastin bestimmt, die $1 \cdot 10^6$ cpm entspricht.

2.2.9.3. Markierung von Herceptin® mit ^{111}In

50 μl Herceptin®-DTPA werden mit 50 μl NaOAc-Puffer (pH 5,4) und 300 μCi $^{111}\text{InCl}_3$ für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Die Qualitätskontrolle findet hier mittels PD10-Säule statt. Zur Vorbereitung wird die Säule mit 10 ml NaOAc-Puffer gespült. Es werden 5 μl markiertes Herceptin® auf die Säule gegeben und anschließend mit NaOAc-Puffer aufgefüllt. Es werden 20 Fraktionen a 13 Tropfen in PS-Röhren aufgefangen und im Bohrloch-Curiemeter gemessen.

Das Ergebnis wird graphisch ausgewertet. Auch hier wird die Menge an markierter Substanz bestimmt, die $1 \cdot 10^6$ cpm entspricht.

Als Inkubationsmedium dienen DMEM bzw. IMDM mit 1 % bovinem Serumalbumin. Desweiteren werden Verdünnungsreihen der Fluoreszenz-markierten Substanzen hergestellt und berechnet wie viele μl Cy5.5-Minigastin/Herceptin® in ein Well gegeben werden müssen, damit in 1 ml Medium eine Konzentration von 10^{-6} - 10^{-12} mol/l vorliegt.

2.2.9.4. Durchführung der Zellversuche

Zunächst wird aus allen 6-Well-Platten das alte Medium abgesaugt und durch 1 ml Inkubationsmedium ersetzt. In jedes Well werden $1 \cdot 10^6$ cpm ^{111}In -Minigastin/Herceptin® gegeben. Drei Wells dienen zur Kontrolle, in diese wird keine Cy5.5-Substanz gegeben. In drei Wells 10^{-6} M Cy5.5-Substanz, in drei

Wells 10^{-7} M Cy5.5-Substanz, usw., bis zu einer Konzentration von 10^{-12} M. Die 6-Well-Platten werden nun bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

Nach der Inkubationszeit werden die Wells drei bis viermal mit PBS 1:10 gewaschen und die Zellen mit 1 ml MOPS/Triton 0,1 % (pH 7,4) abgelöst, sie werden 10 min bei RT bewegt. Die einzelnen Wells werden in kleine PS-Röhrchen überführt und im γ -Counter gemessen.

Um die *counts per minute* mit der Zellzahl korrelieren zu können, findet eine Proteinbestimmung der Proben statt.

2.2.9.5. Proteinbestimmung mit dem Bio-rad Protein Assay

Aus einer Bio-rad Standardproteinlösung werden Standardverdünnungen mit Konzentrationen von 40 $\mu\text{g/ml}$ Protein bis 1000 μg Protein hergestellt.

50 μl jedes Standards werden zu 900 μl isotoner NaCl-Lösung gegeben und 50 μl Färbereagenz von Bio-rad gegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT wird die Extinktion der Proben bei 595 nm gemessen und die Extinktion gegen die Proteinkonzentration graphisch aufgetragen. Als Leerwert dienen 950 μl NaCl-Lösung mit 50 μl Färbereagenz.

Die Proteinkonzentration in den Wells wird wie folgt bestimmt: Zu je 950 μl isotonischer NaCl-Lösung werden 10 μl Zellsuspension aus jedem Well gegeben und 50 μl Färbereagenz zugefügt. Nach 5 min wird auch hier die Extinktion bei 595 nm gemessen.

Mit Hilfe die Standardproteinkurve kann nun auf die in den Wells vorhandene Proteinkonzentration und somit indirekt auf die Zellzahl rückgeschlossen werden.

2.2.9.6. Auswertung der Bindungsversuche

Die gemessene Radioaktivität jedes Wells (*counts per minute*) wird mit der entsprechenden Proteinkonzentration ins Verhältnis gesetzt und aus den Werten der drei Wells gleicher Cy5.5-Substanz Konzentration der Mittelwert gebildet. Die Kontrollwells entsprechen einer Bindung des ^{111}In -markierten Stoffes an den Rezeptor von 100 %. Die Mittelwerte der anderen Wells werden mit 100 % Bindung der Kontrollwells in Beziehung gesetzt.

Die graphische Auswertung erfolgt mit dem Programm Graph Pad Prism, es wird ein *one-side-competition-fitting* durchgeführt und die IC_{50} Werte mit folgender Gleichung berechnet:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{(X - \log(\text{IC}_{50}))})$$

$X = \log(c(\text{Cy5.5-Substanz}))$; $Y = \text{spezifische Bindung der } ^{111}\text{In-Substanz}$

2.2.10. Konfokale Mikroskopie

Mittels konfokaler Mikroskopie kann eine Bindung und eine eventuelle Aufnahme des fluoreszenzmarkierten Proteins in die rezeptorpositiven Zellen beobachtet werden. Für die konfokalen Mikroskopieversuche werden die Zellen wie folgt vorbereitet: SKOV3-Zellen werden in einer 6-Well-Platte, auf deren Boden sich Glasobjektträger befinden, ausgesät und für ungefähr 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Für die Versuche werden einem Well 50 μg Cy5.5-Herceptin[®] zugefügt. Einem zweiten Well werden etwa 70 μg Cy5.5-F(ab')₂-Fragmente zugefügt und einem dritten Well etwa 75 μg Cy5.5-F(ab')-Fragmente. Die Zellen werden weiter unter Standardbedingungen kultiviert und in gewählten zeitlichen Abständen nach Waschen mit PBS unter dem konfokalen Mikroskop betrachtet. Die Zellen werden nicht fixiert, es wird eine Plan-Apochromat 63x/1.4 Öl Linse verwendet.

Die Anregung der Zellen wird mit einer Wellenlänge von 633 nm erreicht und das emittierte Fluoreszenzlicht unter Verwendung eines 650 nm *longpass filters* detektiert. Die optische Schnittebene ist $< 0.8 \mu\text{m}$.

Die konfokalen Mikroskopieversuche wurden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Marburg unter der Anleitung und mit der Unterstützung von HD Dr. Achim Aigner durchgeführt.

2.2.11. Tierversuche

Für die Tierversuche werden Harlan athymische Nacktmäuse verwendet. Die Tierversuche waren von der Tierschutzkommission genehmigt.

2.2.11.1. Tumorinduktion

Zur Tumorinduktion der CCK-rezeptorexprimierenden Tumore werden CCK1- und CCK2-Zellen in 250 ml Gewebekulturflaschen herangezogen. Die Zellen werden zunächst mit Trypsin-EDTA abgelöst, abzentrifugiert und in 1 ml Medium resuspendiert. Die Zellzahl wird mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Um einen Tumor zu induzieren benötigt man etwa fünf bis sechs Millionen Zellen. Diese Zellmenge wurde den Mäusen subkutan in die Flanke injiziert. Jeder Maus wurden zwei Tumore gesetzt, einen rezeptorpositiven und einen rezeptornegativen Tumor.

Die Tumorinduktion der ErbB/HER2-Rezeptor tragenden Tumore erfolgt analog. Es wurden SKOV3-Zellen verwendet, da SKBR3 Zellen für die Tumorinduktion in athymischen Mäusen ungeeignet sind (Barbacci et al., 2003). Die benötigte Zellzahl beträgt ebenfalls zwischen fünf und sechs Millionen Zellen. Pro Maus wurden hier zwei rezeptorpositive Tumore gesetzt.

Nach etwa zwei bis drei Wochen waren die Tumore groß genug, um mit den Versuchen zu beginnen.

2.2.11.2. Narkose

Für die Fluoreszenzaufnahmen mit der CCD-Kamera war eine Narkotisierung der Mäuse notwendig. Dafür wurden 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 1,5 mg/kg Körpergewicht Xylazin intraperitoneal injiziert. Bei länger dauernden Sequenzaufnahmen wurde, wenn nötig nochmals nachinjiziert. Während der Narkose wurden die Mäuse mit Hilfe einer Rotlicht-Lampe vor Auskühlung geschützt. Um die Augen vor Austrocknung zu schützen, wurden sie mit isotoner Kochsalzlösung befeuchtet.

2.2.11.3. Fluorescence reflectance imaging (FRI)-Aufnahmen

Für die FRI-Aufnahmen wurde ein FRI-System von Hamamatsu Photonics verwendet. Das System besteht, wie in Abb. 2.1 gezeigt, aus einer CCD-Kamera, einer Wolframlampe mit einem HQ 650/45-Anregungsfilter zur Einstellung der richtigen Anregungswellenlänge, einer Wasserkühlung für die CCD-Kamera und einer lichtundurchlässigen Box. Als Emissionsfilter wird ein HQ 710/50-Bandpass-Sperrfilter verwendet, dieser Filter lässt elektromagnetische Strahlung der Wellenlängen zwischen 680 und 740 nm passieren.

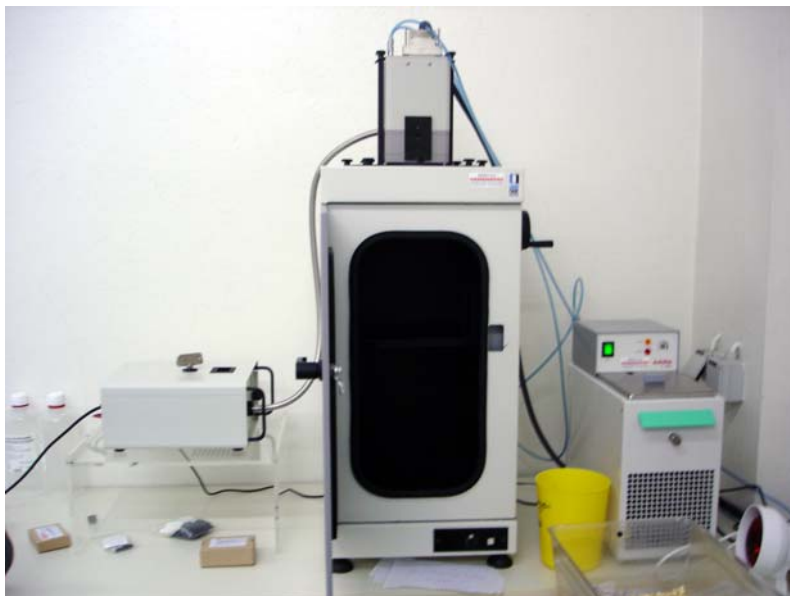


Abb. 2.1: FRI-System von Hamamatsu Photonics, bestehend aus einer Wolfram-lichtquelle, CCD-Kamera, Kühlung und verschiedenen Filtern.

Das Funktionsprinzip eines FRI-Systems wurde bereits an anderer Stelle beschrieben, auch eine schematische Darstellung des Systems wurde gezeigt (Abb.1.3). Die Mäuse werden für die Bildgebung zunächst in der lichtundurchlässigen Box platziert. Die Aufnahmen werden bei niedriger Empfindlichkeit und Belichtungszeiten zwischen 20 und 200 ms angefertigt. Die Auswertung und Quantifizierung des Fluoreszenzsignals versus Hintergrundsignal erfolgte mit der Software Wasabi.

3. Ergebnisse

3.1.1. Synthese von Cy5.5-D-Glu¹-Minigastrin

Die Synthesevorschrift für Cy5.5-Minigastrin wurde bereits im Methodenteil dieser Arbeit ausführlich dargestellt. Der Reaktionsablauf wurde mittels HPLC kontrolliert, nachdem zunächst die Retentionszeiten der einzelnen Edukte ermittelt wurden. HOBt (*N*-Hydroxybenzotriazol) hat eine Retentionszeit von etwa 14 min. Cy5.5-NHS weist eine Retentionszeit von etwa 16 min auf und absorbiert bei 674 nm. D-Glu¹-Minigastrin hat eine Retentionszeit von 18-19 min und absorbiert nur bei einer Absorptionswellenlänge von 280 nm; der Produktpeak ist nach 16,5 min bei 280 und 674 nm zu erkennen.

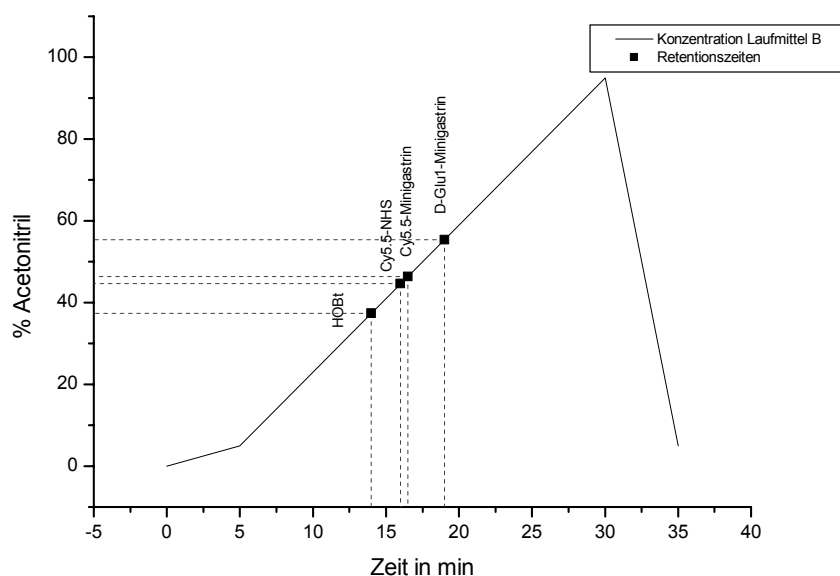


Abb. 3.1: HPLC-Methode: Flussgeschwindigkeit 1 ml/min, Laufmittel A: H₂O + 0,1 % TFA, Laufmittel B: 70 % Acetonitril; die Retentionszeiten der einzelnen Verbindungen sind eingezeichnet.

3. Ergebnisse

Die besten Ergebnisse wurden nach 36-48 h Reaktionszeit und mit Natriumhydrogencarbonatpuffer (pH-Wert 9,5) erzielt. pH-Werte von 7,5-8,5 ließen nur deutlich schlechtere Ausbeuten zu.

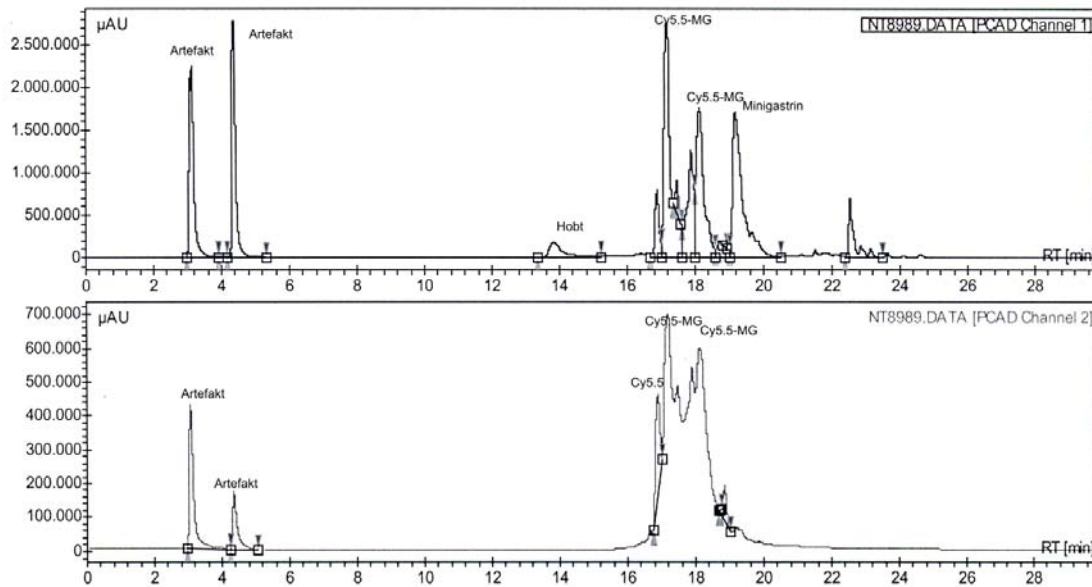


Abb. 3.2: Kontrolle des Reaktionsablaufs zur Synthese von Cy5.5-Minigastrin, oben UV-Vis-Kanal1 (280 nm), unten UV-Vis-Kanal2 (674 nm).

Die Abbildung 3.2 zeigt, dass bei der Reaktion von Cy5.5-NHS und D-Glu¹-Minigastrin mehrere verschiedene Produkte entstanden sind. Diese ließen sich, wie in den unten dargestellten Läufen zu sehen ist, in zwei Hauptfraktionen auftrennen. Diese Fraktionen wurden im Weiteren für die Zellversuche verwendet.

3. Ergebnisse

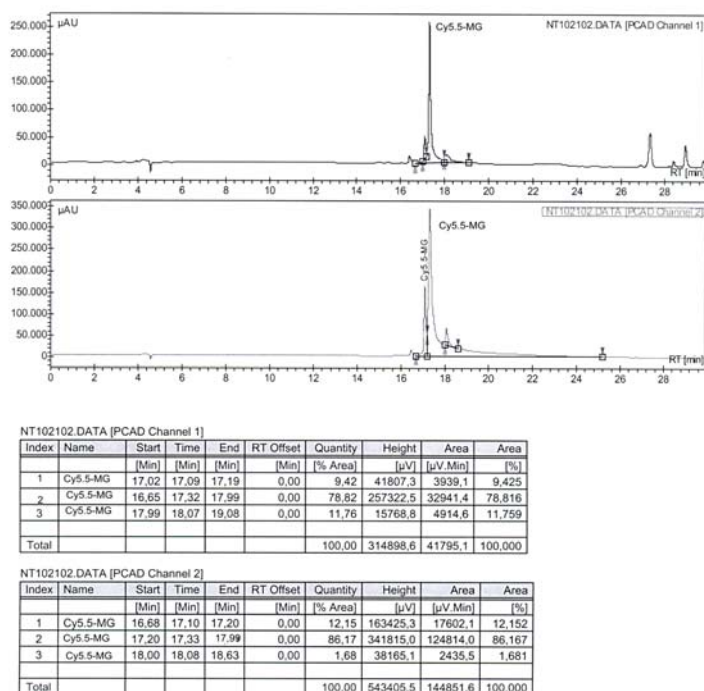


Abb. 3.3: Cy5.5-Minigastrin nach der Aufreinigung, oben UV-Vis-Kanal1 (280 nm), unten UV-Vis-Kanal2 (674 nm).

3.1.2. Bindungsstudie Cy5.5-Minigastrin

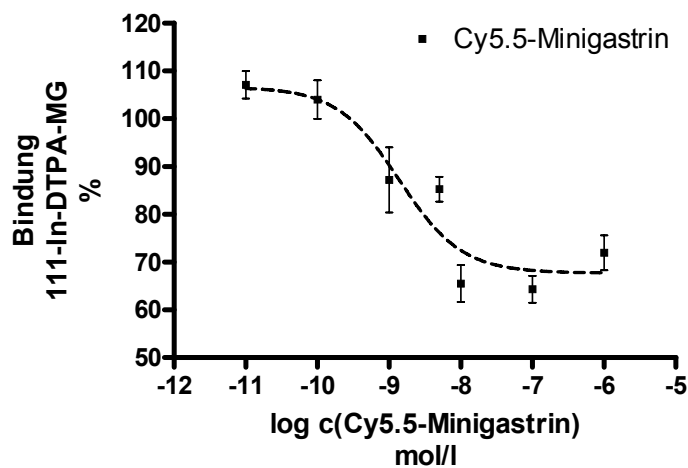


Abb. 3.4: Bindungsstudie Cy5.5-Minigastrin.

Abb. 3.4 zeigt das Ergebnis der Verdrängungsbindungsstudie von Cy5.5- Minigastrin. Als Blocksubstanz diente ^{111}In markiertes DTPA-D-Glu¹-Minigastrin. Es wurden Verdrängungskonzentrationen von 10^{-11} - 10^{-6} mol/l Cy5.5-Minigastrin eingesetzt.

Die spezifische Bindung von ^{111}In -DTPA-D-Glu¹-Minigastrin lag immer über 65 %.

3.1.3. Tierversuche mit Cy5.5-Minigastrin

Nachdem in den Zellbindungsversuchen nicht eindeutig gezeigt werden konnte, dass Cy5.5-Minigastrin in ausreichendem Maße *in vitro* an SKBR3-Zellen bindet, wurde dennoch ein Versuch der Fluoreszenzbildgebung gemacht. Aufgrund der Erfahrungen mit radioaktivmarkiertem Minigastrin und der geringen Größe des Peptids sollten aussagekräftige Bilder nach etwa 4 h zu erhalten sein.

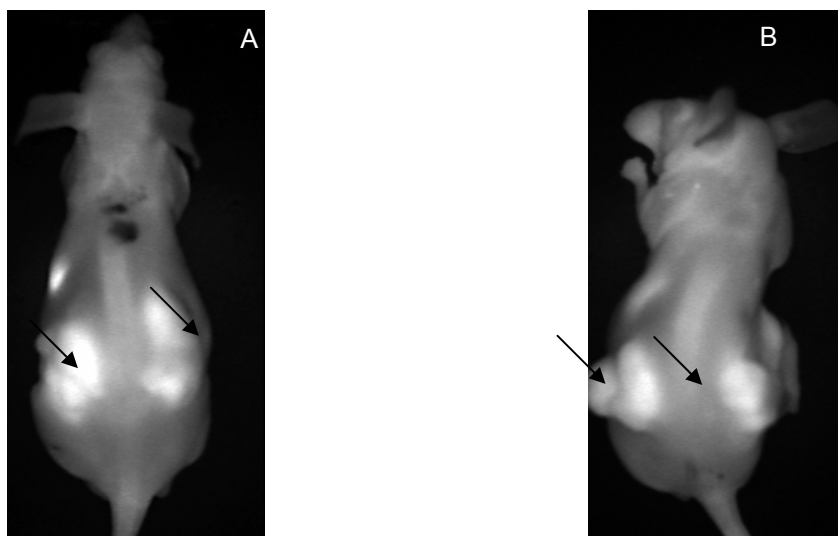


Abb. 3.5: Nacktmäuse 4 h nach Injektion von Cy5.5-Minigastrin, Fluoreszenzbilder (A-B). Die Tumore sind mit Pfeilen markiert (n = 3).

3. Ergebnisse

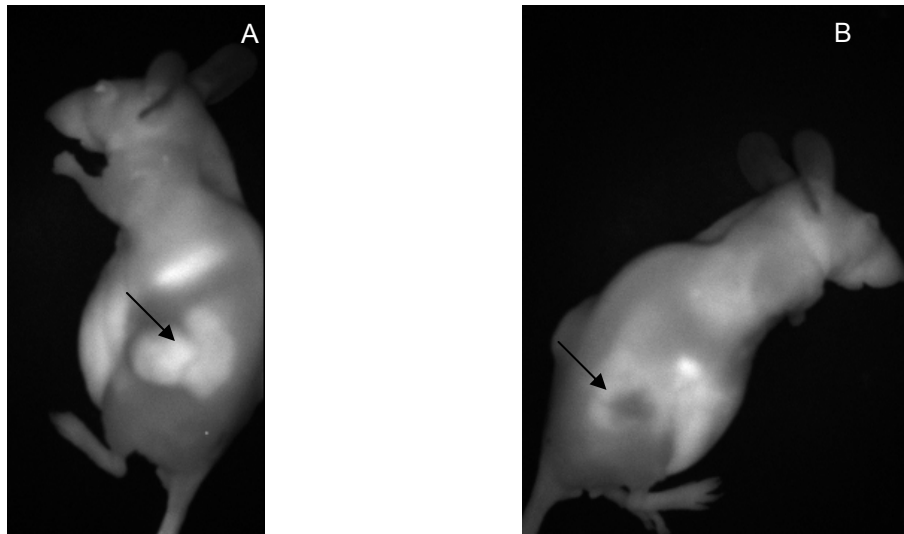


Abb. 3.6: Nacktmäuse 4 h nach Injektion von Cy5.5-Minigastrin, Fluoreszenzbilder (A-B). Die Tumore sind mit Pfeilen markiert (n = 3).

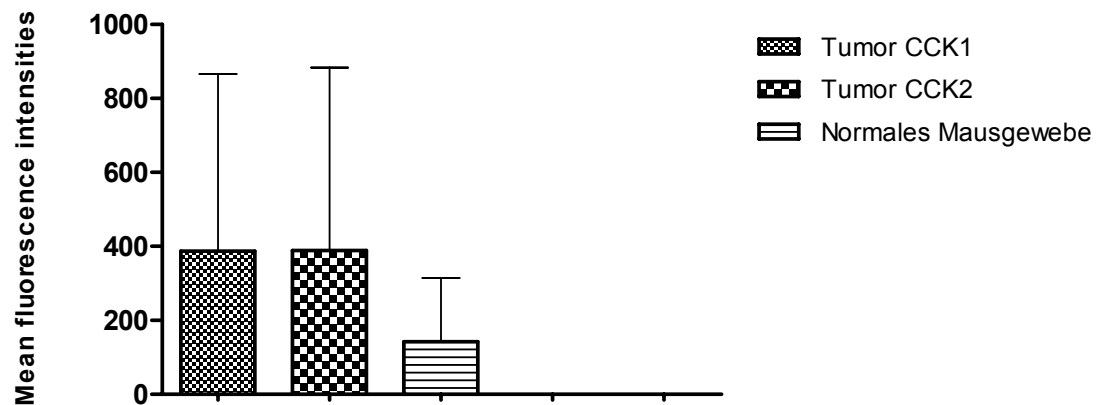


Abb. 3.7: Mittlere Fluoreszenzintensitäten 4 h nach Injektion von Cy5.5-Minigastrin

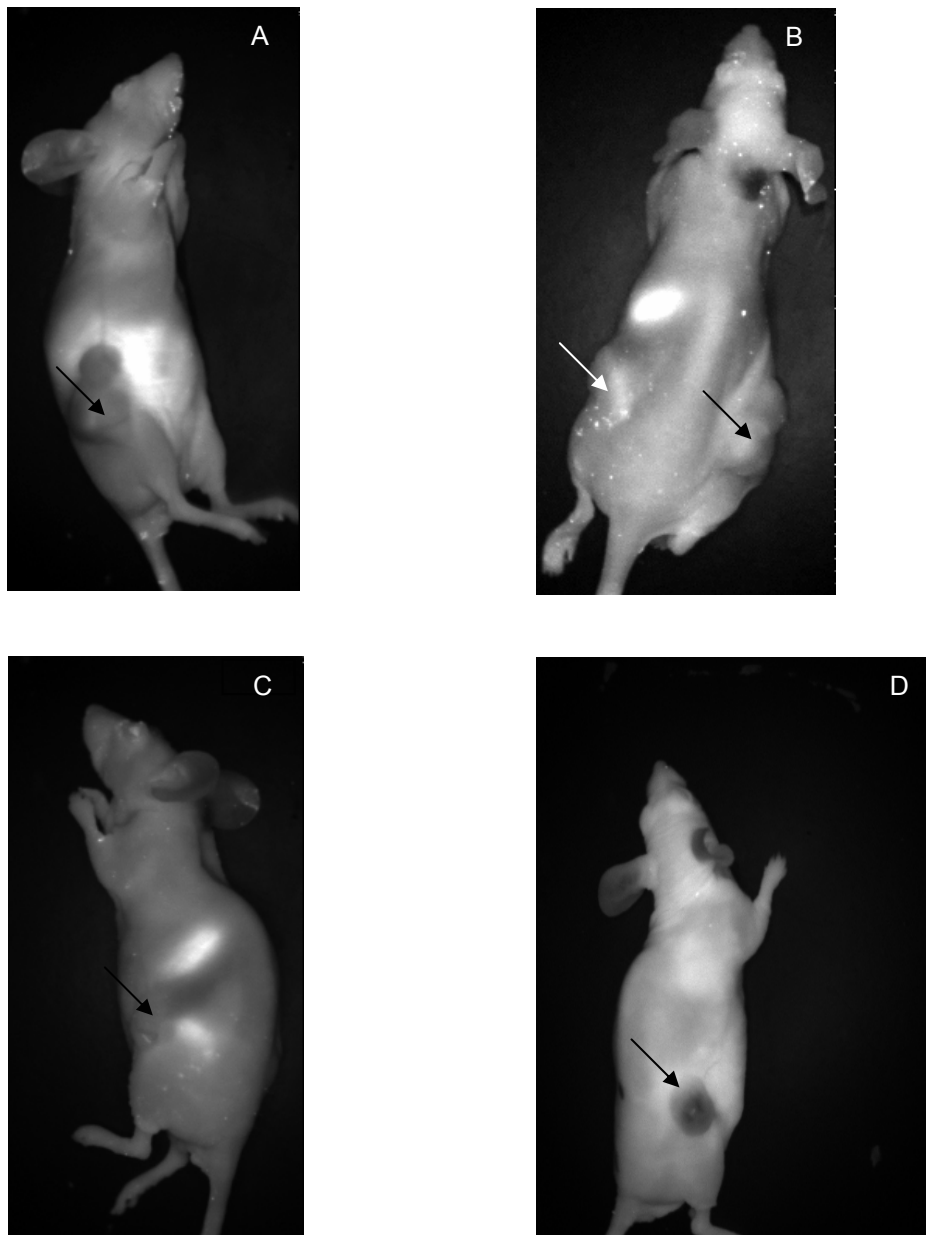


Abb. 3.8: Nacktmäuse (n = 5) 4 h nach Injektion von Cy5.5-Minigastrin, 2.Versuchsansatz, Fluoreszenzbilder (A-D). Die Tumore sind mit Pfeilen markiert.

Wie aus den Bildern ersichtlich ist, waren hier die Ergebnisse nicht eindeutig zu bewerten. In einigen Mäusen zeigte sich 4 h nach Injektion von Cy5.5-Minigastrin in der Bildgebung eine Anreicherung, sowohl in dem CCK2-, als auch in dem CCK1-positiven Tumor, so dass man nicht von einer Selektivität

3. Ergebnisse

bezüglich des CCK2-Rezeptors sprechen konnte. Bei der Wiederholung des Versuches zeigte sich, dass die Tumore nun überhaupt keinen Fluoreszenzfarbstoff anreicherten, es war lediglich eine diffuse Fluoreszenz im Abdominalbereich, sowie in Leber und Milz zu erkennen.

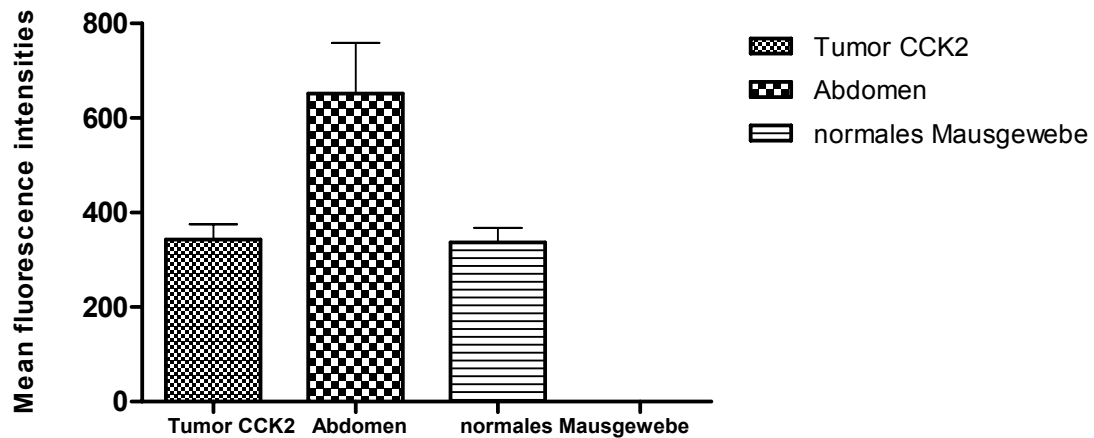


Abb. 3.9: Mittlere Fluoreszenzintensitäten 4 h nach Injektion von Cy5.5-Minigastrin im wiederholten Versuchsansatz. Keine wesentliche Fluoreszenz im Tumor im Vergleich zu normalem Mausgewebe.

3. Ergebnisse

3.2.1. Synthese Cy5.5-Herceptin®

Wie aus Abbildung 3.8 zu entnehmen ist, konnte Cy5.5-Herceptin® nach der im Methodenteil ausgeführten Reaktionsvorschrift erfolgreich synthetisiert und isoliert werden. Das HPLC-Diagramm zeigt eine Kontrolle des Reaktionsablaufs nach 24 h Reaktionszeit.

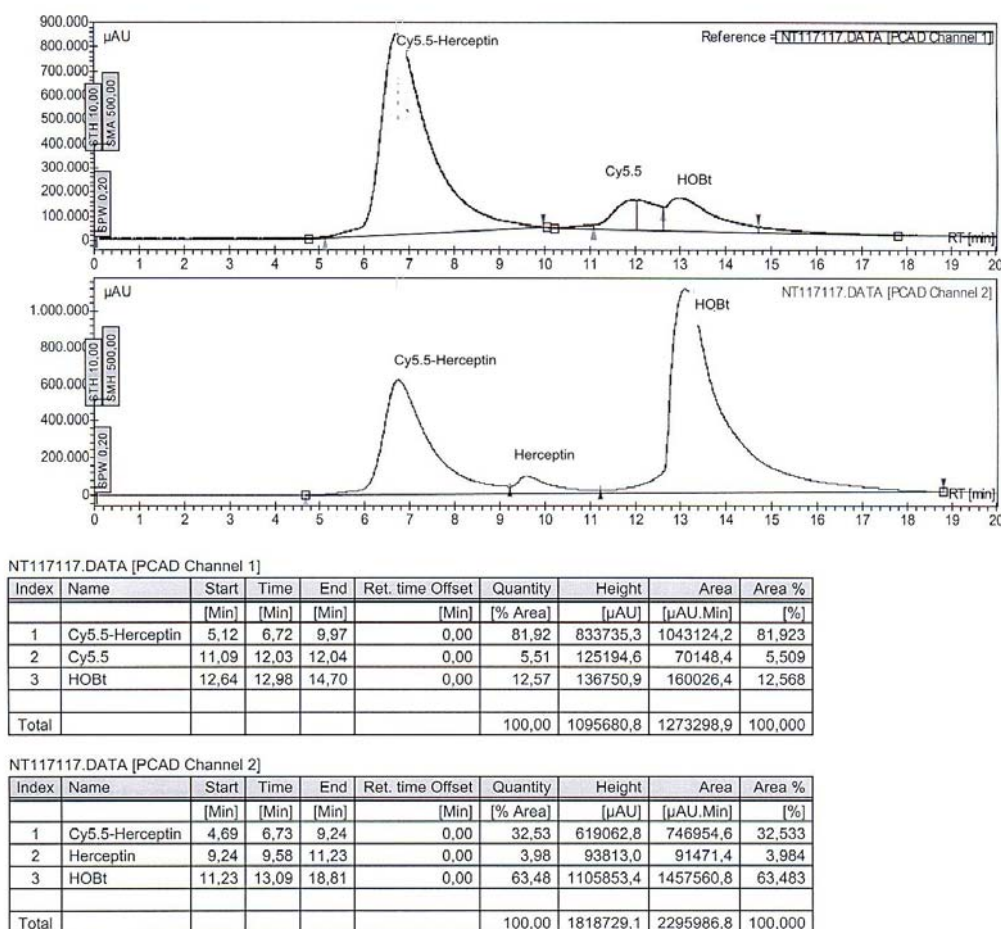


Abb. 3.10: Kontrolle des Reaktionsablaufs zur Synthese von Cy5.5-Herceptin®, oben UV-Vis-Kanal1 (674 nm), unten UV-Vis-Kanal 2 (280 nm).

Der Produktpeak ist bei 6,7 min bei beiden Absorptionswellenlängen deutlich sichtbar, es finden sich aber ebenfalls beide Edukte. Der Cy5.5-Peak ist bei 12 min und 674 nm, der Herceptin®-Peak bei 9,58 min und 280 nm sichtbar. Ein HOBt-Peak ist bei 13 min zu sehen. Mit der Aufreinigung wurde deshalb noch

3. Ergebnisse

einige Stunden gewartet. Das HOBt konnte durch die Filtration mit einem Zentrifugenfilter vollständig entfernt werden, wie aus der HPLC-Kontrolle (Abb.3.9) ersichtlich ist. Der Produktpeak liegt hier bei 7,2 min. Die Synthese von Cy5.5-Herceptin konnte mehrmals mit großer Zuverlässigkeit reproduziert werden.

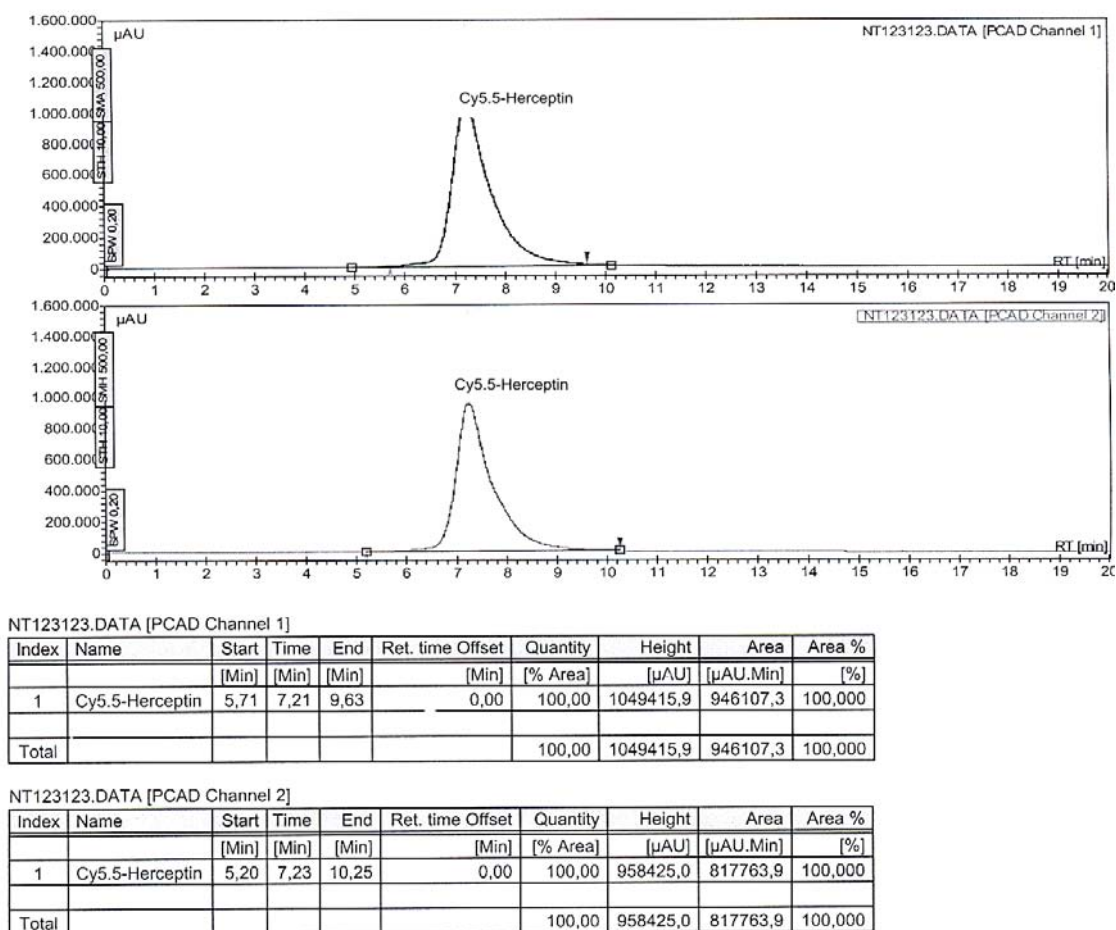


Abb. 3.11: Cy5.5-Herceptin® nach der Aufreinigung, oben UV-Vis-Kanal1 (674 nm), unten UV-Vis-Kanal2 (280 nm).

3.2.2. Bindungsstudie mit Cy5.5-Herceptin®

Die Bindungsstudie wurde zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes durchgeführt. Dieser Wert ist ein ungefähres Maß für die Affinität eines Pharmakons zu

3. Ergebnisse

seinem Rezeptor. Die Affinität eines Liganden zu seinem Rezeptor wird durch den K_D -Wert ausgedrückt, dieser zeigt, bei welcher Konzentration eines Liganden 50 % der Rezeptoren besetzt sind. Der IC_{50} ist die Konzentration eines Pharmakons bei der 50 % der Wirkung des Pharmakons erreicht werden. In unserem Fall ist der IC_{50} die Verdrängungskonzentration, bei der die spezifische Bindung des Radioliganden 50 % beträgt und zeigt somit die relative Affinität des nicht radioaktiv markierten Liganden zum Rezeptor.

K_D -Wert und IC_{50} -Wert sind zwei verschiedene Werte, der K_D -Wert ist ein absoluter Wert, der IC_{50} -Wert ein relativer Wert, um aus dem IC_{50} den K_D -Wert einer Substanz zu ermitteln, muss mindestens ein K_D -Wert der eingesetzten Substanzen bekannt sein. Unter gleichen Versuchsbedingungen sind die IC_{50} -Werte miteinander vergleichbar.

Die IC_{50} -Werte wurden mit einer ErbB/Her2-Rezeptor positiven Zelllinie SKBR3 erhoben. Zunächst wurde der IC_{50} von unmarkiertem Herceptin® bestimmt.

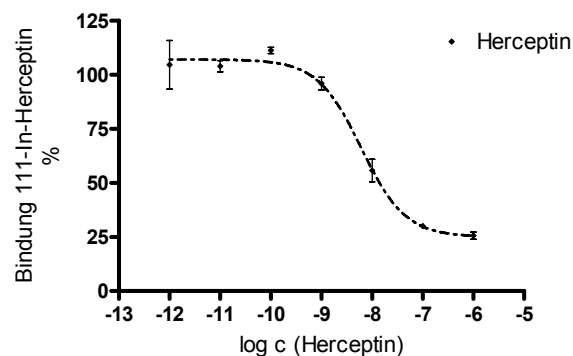


Abb. 3.12: Darstellung der Bindungsaffinität von Herceptin® zum Erb/Her2-Rezeptor.

Für Herceptin® wurde ein IC_{50} -Wert von $6.15 \cdot 10^{-9} \pm 7.38 \cdot 10^{-10}$ mol/l ermittelt, es wurden Verdrängungskonzentrationen von 10^{-12} - 10^{-6} mol/l eingesetzt. Dieser IC_{50} -Wert dient zum Vergleich mit denen der fluoreszenzmarkierten Liganden.

3. Ergebnisse

Derselbe Versuch wurde mit Cy5.5-Herceptin® in Konzentrationen von 10^{-10} - 10^{-6} mol/l wiederholt. Die Inhibitionskurve ist untenstehend gezeigt. Der hieraus ermittelte IC_{50} -Wert beträgt $3.39 \cdot 10^{-8} \pm 5.66 \cdot 10^{-9}$ mol/l.

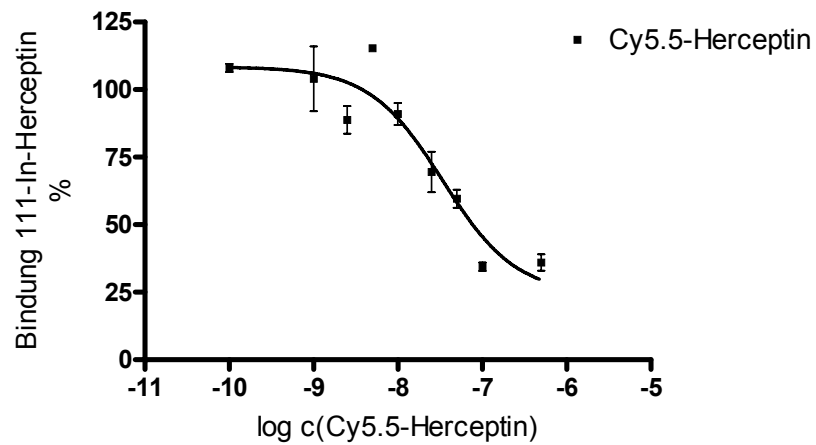


Abb. 3.13: Darstellung der Bindungsaffinität von Cy5.5-Herceptin® zum ErbB/Her2-Rezeptor.

3.2.3. Konfokale Mikroskopie von Cy5.5-Herceptin®

Um die Rezeptorzellbindung von Cy5.5-Herceptin® auch *in vitro* zu beobachten und die Frage zu klären, ob der Ligand-Rezeptor-Komplex in die Zellen internalisiert wird, wurden konfokale Mikroskopieversuche durchgeführt. Gezeigt sind jeweils die Fluoreszenzaufnahme, ein Nativbild und die Fusion aus beiden Bildern.

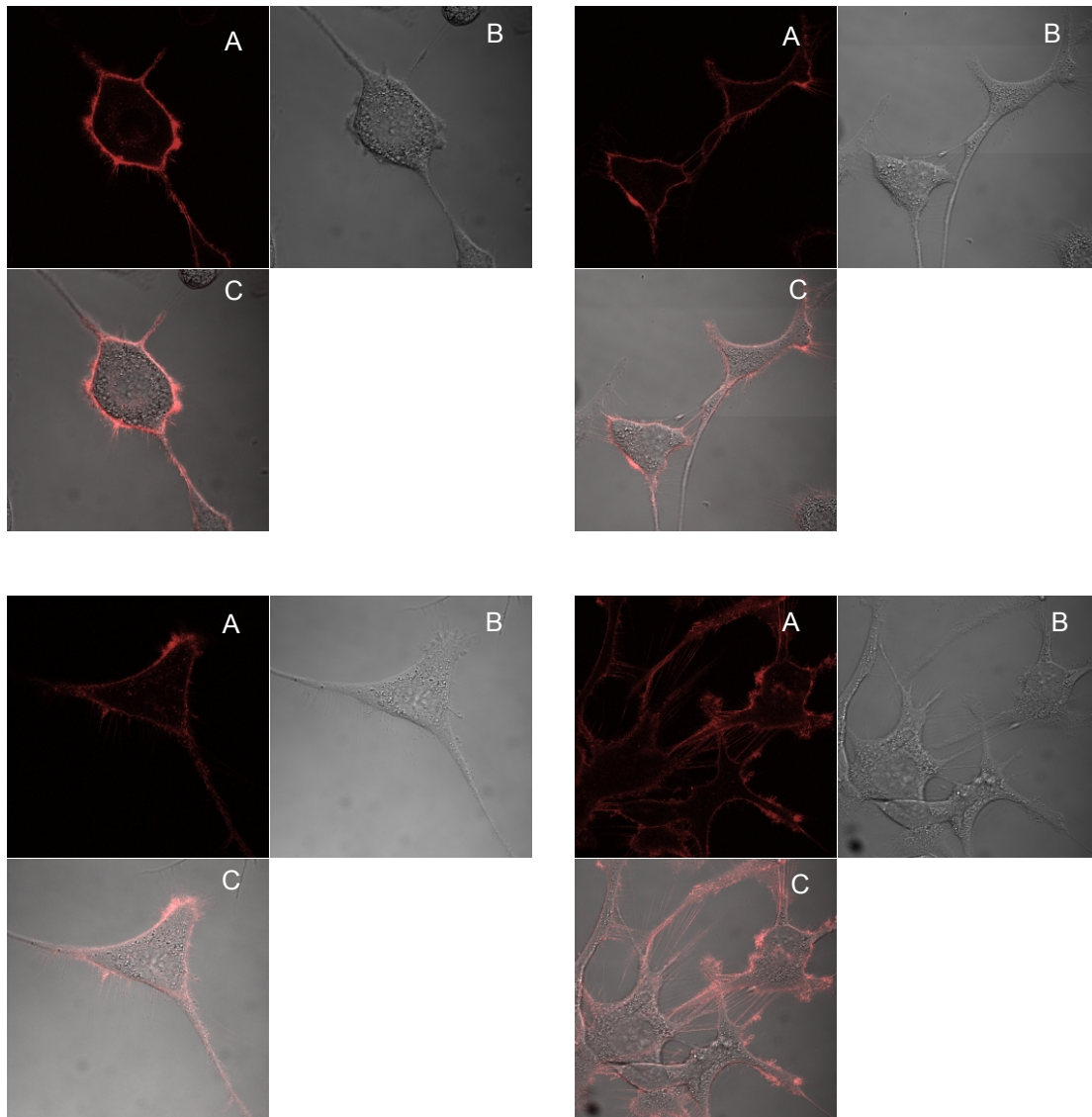


Abb. 3.14: SKOV3-Zellen nach 30 min Inkubation mit Cy5.5-Herceptin®, Fluoreszenzbild (A), Nativbild (B), fusioniertes Bild (C).

3. Ergebnisse

Nach 30 min Inkubation der ErbB/Her2-Rezeptor tragenden SKOV3- Zellen mit 50 µg Cy5.5 markierten Herceptins® konnte eine deutliche Anlagerung der Substanz an die Zellmembranen beobachtet werden.

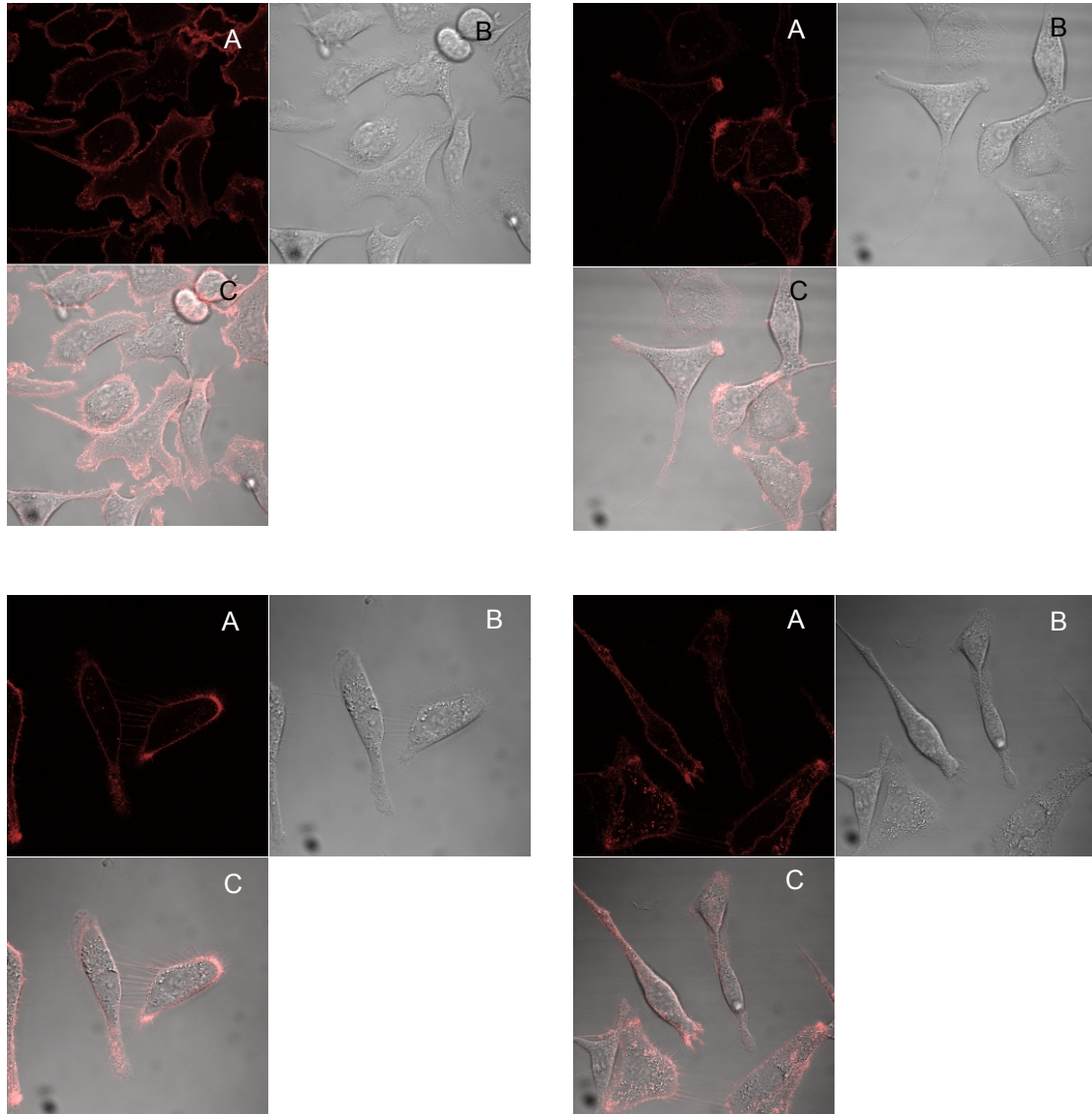


Abb. 3.15: SKOV3-Zellen nach 3 h bis 4 h Inkubationszeit mit Cy5.5-Herceptin®. Fluoreszenzbild (A), Nativbild (B), fusioniertes Bild (C).

Nach weiteren 3 h fanden sich immer noch fluoreszierendes Herceptin® an den Zellwänden und Zellausläufern der Zellen. Im Zellinneren fand sich bei den Zellen in der Betrachtungsebene keinerlei Fluoreszenz.

3. Ergebnisse

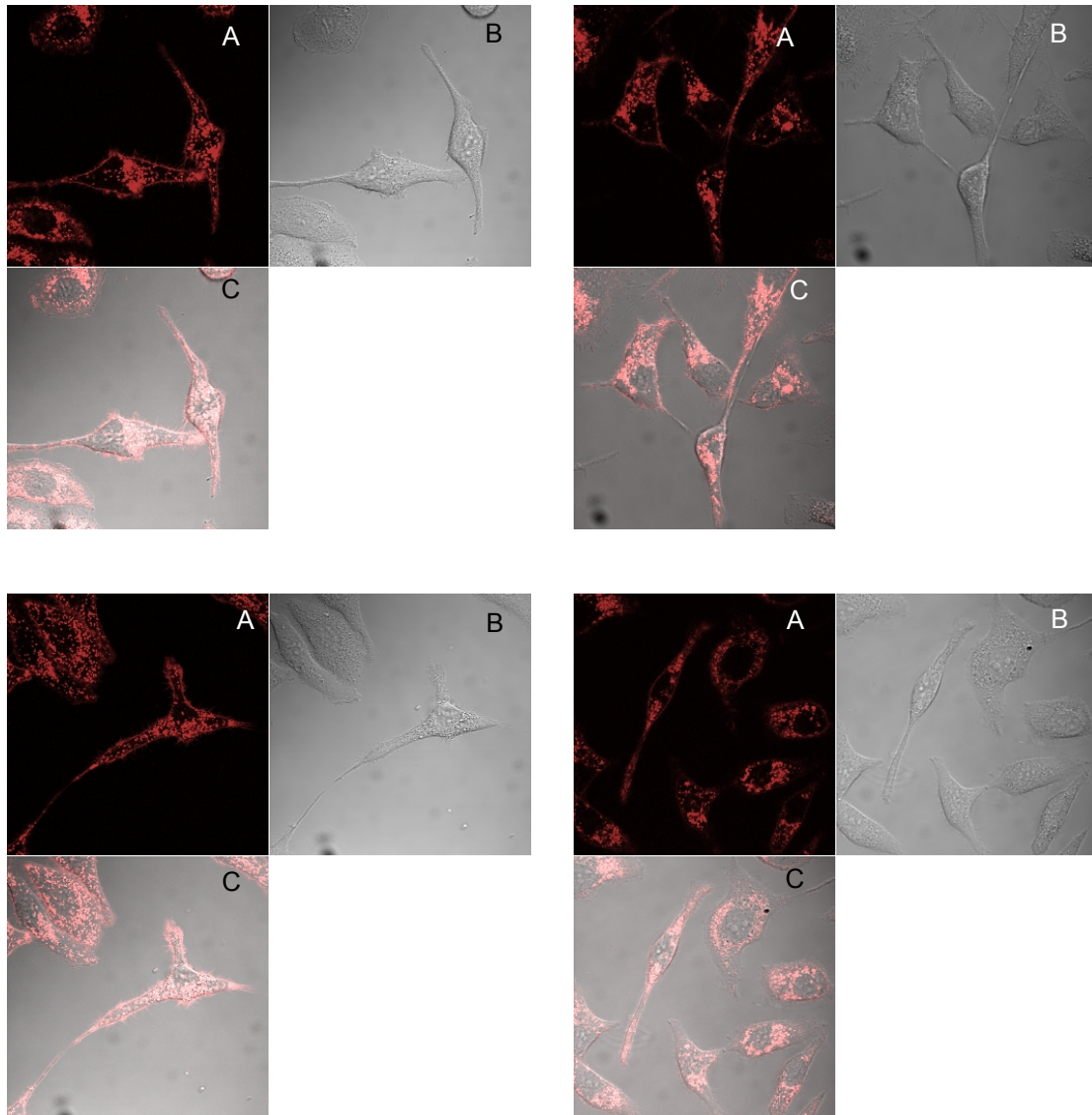


Abb. 3.16: SKOV3-Zellen nach 24h Inkubation mit Cy5.5-Herceptin®. Fluoreszenzbild (A), Nativbild (B), fusioniertes Bild (C).

Bei der nächsten Betrachtung der Zellen nach 24 h Inkubationszeit mit Cy5.5-Herceptin® zeigte sich ein deutlich anderes Bild, in nahezu allen Zellen des Betrachtungsfelds waren starke Fluoreszenzsignale im Zytoplasma der Zellen zu beobachten. Dies spricht für eine Aufnahme des Cy5.5-Herceptins® in die SKOV3-Zellen. Wie ebenfalls ersichtlich ist, blieb der Zellkern der Zellen jedoch ausgespart.

Es wurde auch eine Negativkontrolle mit SKOV3-Zellen durchgeführt, die den ErbB/Her2-Rezeptor nicht exprimierten. Bei einem Großteil der Zellen zeigte sich auch nach 20 h außer einer Anlagerung an die Zellmembranen keine Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes in das Zellinnere. In einigen Zellen jedoch fand sich eine Aufnahme des Farbstoffs in die Zelle. Später stellte sich heraus, dass die Zelllinie nicht mehr vollständig rezeptorfrei war, sondern wieder begonnen hatte, den ErbB/Her2-Rezeptor zu exprimieren. Durch Expression dieses Wachstumsfaktorrezeptors sichern sich die Zellen einen Selektionsvorteil gegenüber den rezeptorlosen Zellen.

3.2.4. Tierversuche mit Cy5.5-Herceptin®

In dieser Arbeit wurde die Darstellung des ErbB/Her2-Rezeptors mit drei verschiedenen Liganden ausgetestet und miteinander verglichen. Zunächst wurden einigen Mäusen 50 µg Cy5.5-Herceptin® verabreicht und nach 0, 4, 12, 48 und 72 h wurden Fluoreszenzaufnahmen angefertigt; die Ergebnisse sind nachfolgend gezeigt.

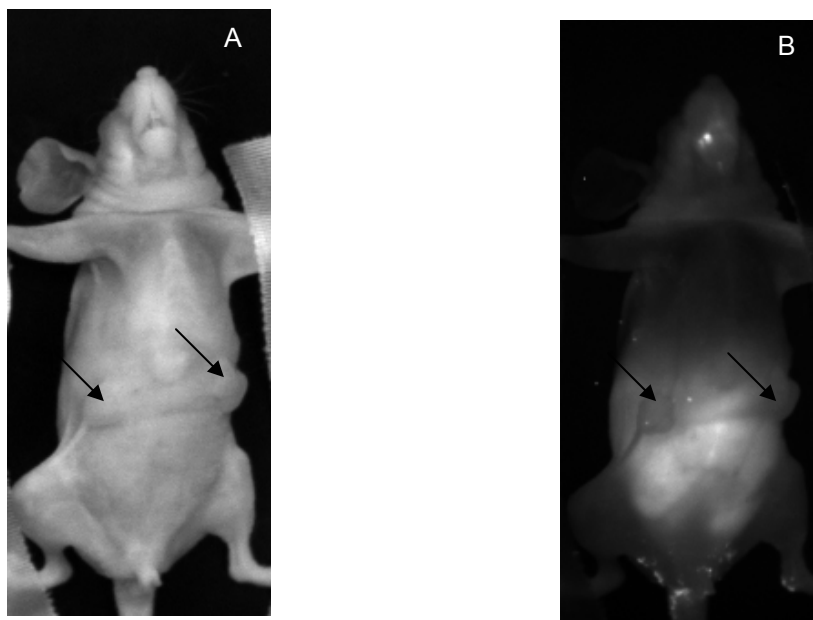


Abb. 3.17: Nacktmäuse (n = 5) 4 h nach Injektion des Cy5.5-markierten Antikörpers. Nativbild (A), Fluoreszenzbild (B). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.

3. Ergebnisse

0 bis 4 h nach Injektion des Cy5.5-markierten Antikörpers stellt sich der Tumor in der Fluoreszenzbildgebung nicht deutlich dar. Es findet sich lediglich eine diffuse Fluoreszenz im Abdominalbereich der Maus.

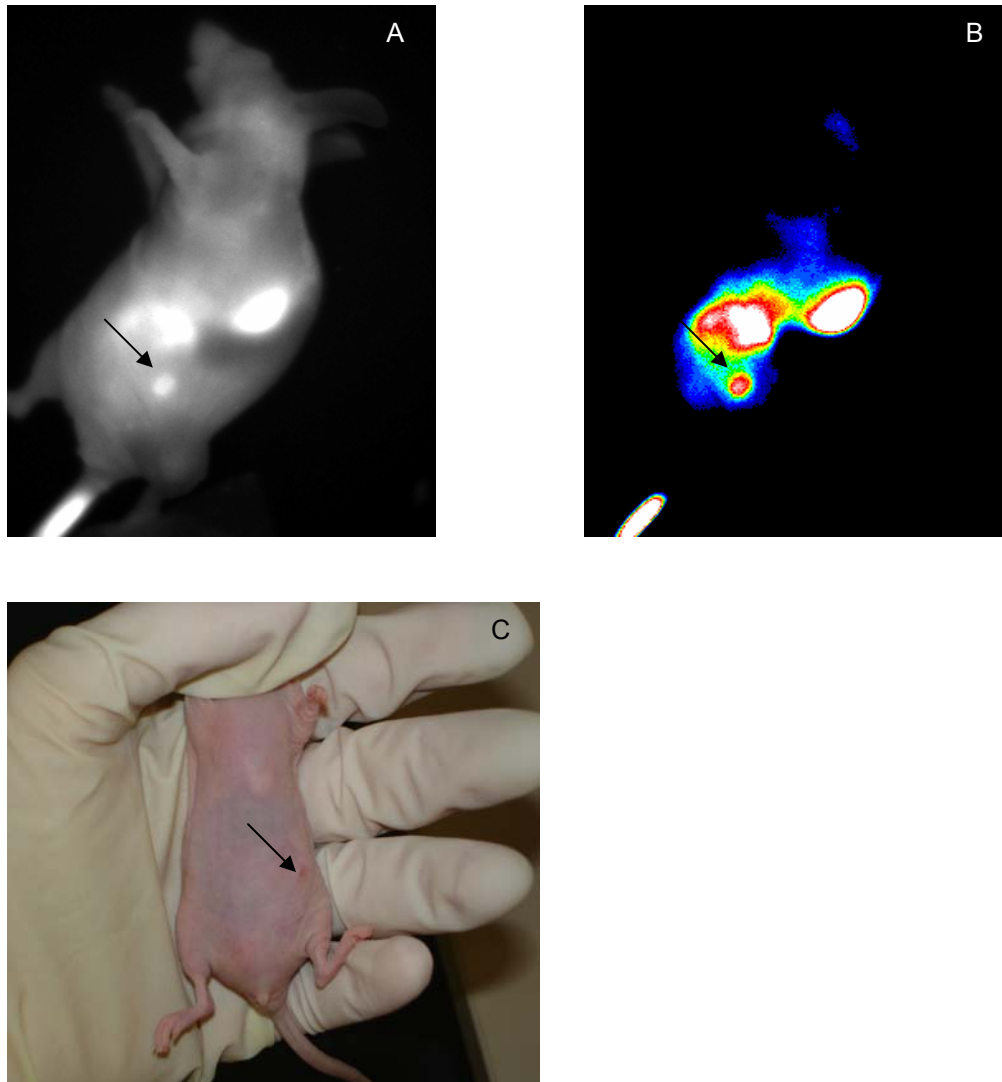


Abb. 3.18: Nacktmaus (n = 5) 24 h nach Injektion des Cy5.5-markierten Herceptins®. Fluoreszenzbild (A), farbkodiertes Bild (B), Photographie (C). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.

3. Ergebnisse

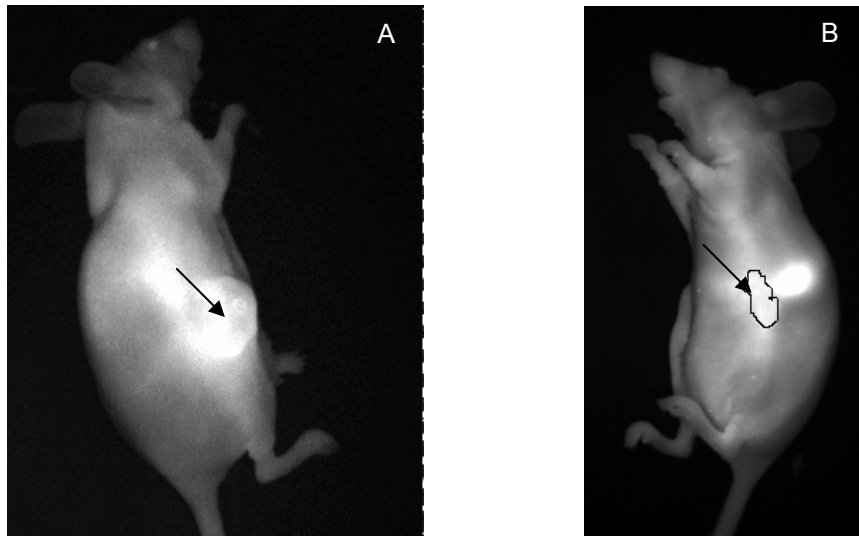


Abb. 3.19: Nacktmäuse (n = 5) 24 h nach Injektion des Cy5.5-markierten Herceptins®. Fluoreszenzbilder (A, B). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.

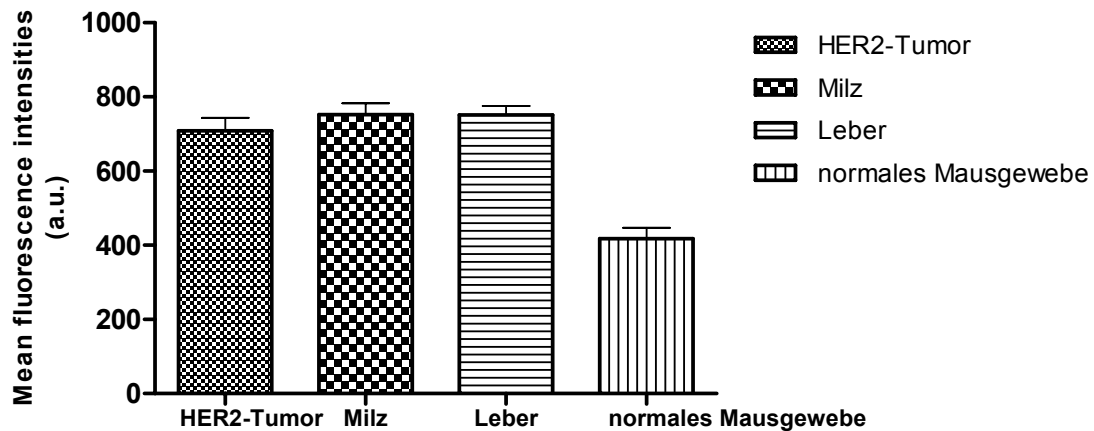


Abb. 3.20: Mittlere Fluoreszenzintensitäten (arbitrary units (a.u.) 24 h nach Injektion von Cy5.5-Herceptin. Es zeigt sich eine deutliche Fluoreszenz im Bereich des Tumors, der Leber und der Milz.

Nach 24 h stellt sich der Tumor in der Bildgebung deutlich dar. Eine Mehranreicherung zeigt sich in der Milz und in der Leber. Dies könnte in einer Bindung des Cy5.5-Herceptins® an Her2-ECD (*extracellular domain*), einem

3. Ergebnisse

Her2-Rezeptorfragment, im Serum, begründet liegen. Her2-ECD (95 kD) entsteht durch eine langsame proteolytische Spaltung des Her2-Rezeptors (185 kD) und wird in Leber und Milz abgebaut. Der Versuch die Her2-ECD-Fragmente durch die Vorinjektion von 100, 500 und 1000 µg gänzlich unmarkierten Herceptins® abzufangen und so zu neutralisieren, brachte keinen deutlichen Unterschied in Bezug auf die Fluoreszenzanreicherung in Milz- und Leber, der Tumor jedoch wurde weniger Kontrast gebend. Die in Abbildung 3.16 zu beobachtende Fluoreszenzanreicherung im Schwanzbereich der Maus beruht auf einer *para* - Injektion des Farbstoffes.

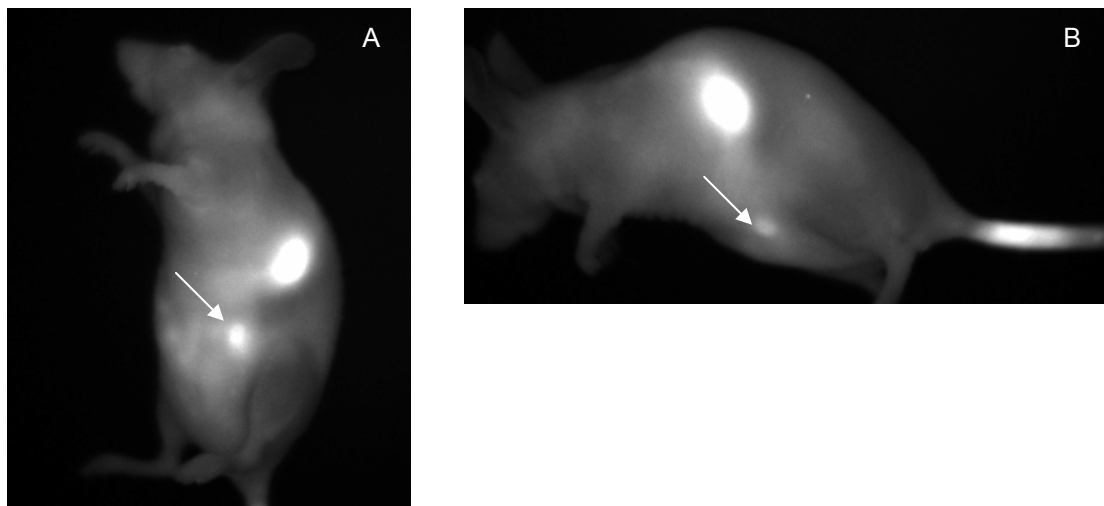


Abb. 3.21: Nacktmäuse (n = 5) 48 h nach Injektion des Cy5.5-markierten Herceptins®, Fluoreszenzbilder (A, B). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.

Auch nach 48 h ist der Tumor sehr gut darzustellen, eine deutliche Anreicherung findet sich noch immer in der Milz; die Fluoreszenz der Leber hingegen ist schwächer.

3. Ergebnisse

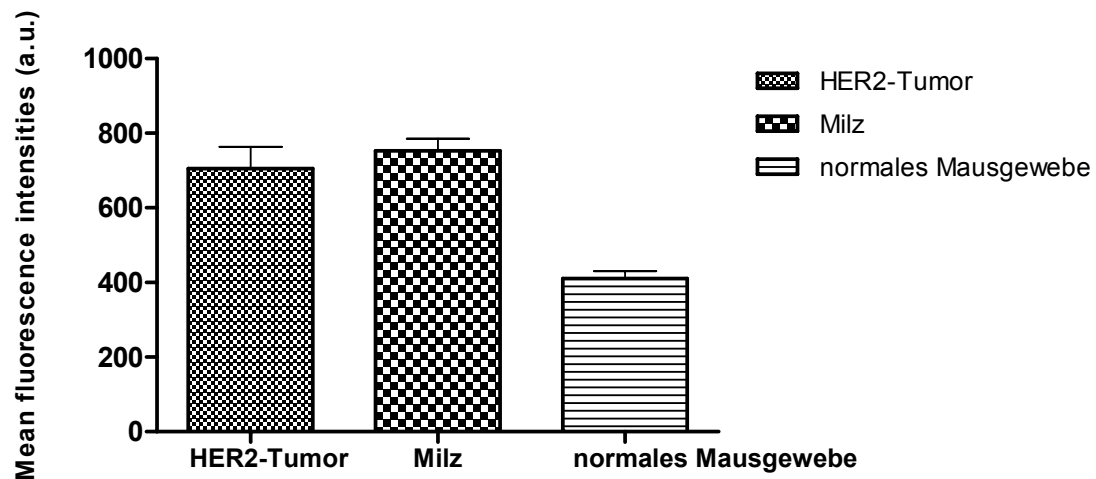


Abb. 3.22: Mittlere Fluoreszenzintensitäten des ErbB/Her2 positiven Tumors, der Milz und Referenzgewebes 48 h nach Injektion von Cy5.5-Herceptin.

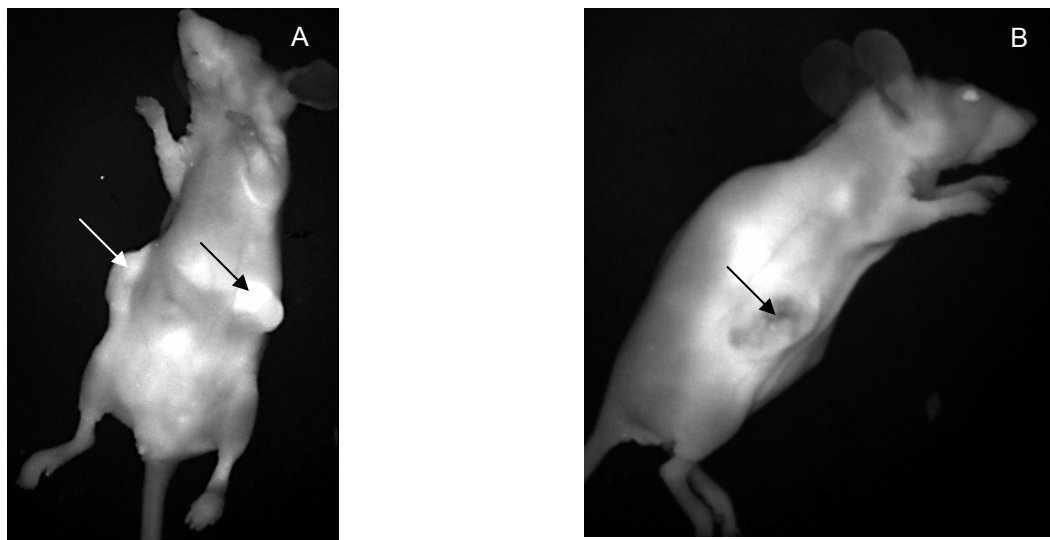


Abb. 3.23: Nacktmäuse (n = 5) 72 h nach Injektion des Cy5.5-markierten Herceptins®, Fluoreszenzbilder (A, B). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.

72 h nach Injektion des Tracers lässt sich der Tumor noch immer nachweisen, das Signalrauschverhältnis ist jedoch sehr viel schlechter.

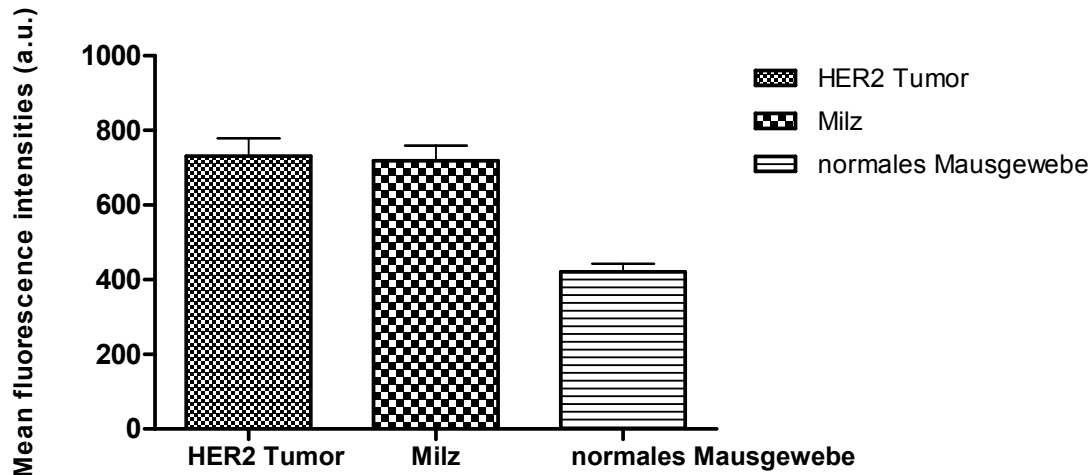
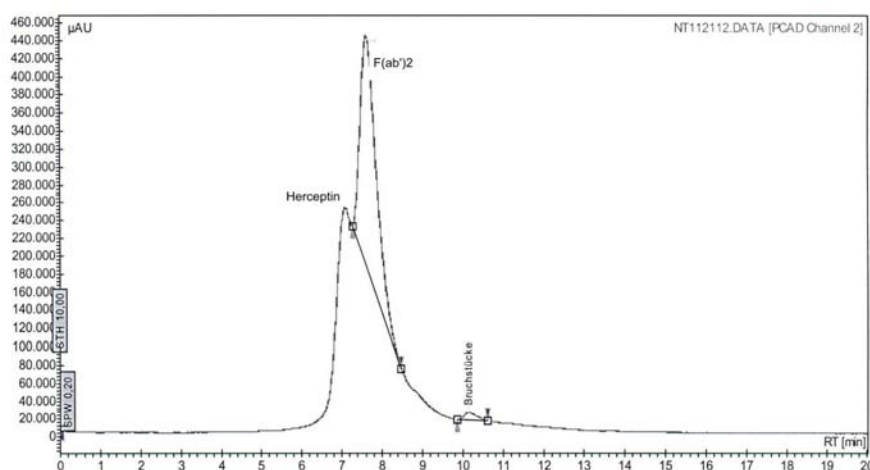


Abb. 3.24: Mittlere Fluoreszenzintensitäten des ErbB/Her2 positiven Tumors, der Milz und Referenzgewebes 72 h nach Injektion von Cy5.5-Herceptin.

Die eben vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass Cy5.5-Herceptin[®] für die *in vivo* NIR-Fluoreszenzbildgebung am Kleintier geeignet ist. Der Antikörper Herceptin[®] ist mit einem Molekulargewicht von 148 kD ein eher großes Molekül und verfügt nicht über die günstigen Eigenschaften, die Minigastrin für die Bildgebung interessant machen. Die auf Peptiden basierende Bildgebung hat den Vorteil, dass Peptide als Moleküle mit geringem Molekulargewicht leicht in alle Gewebe penetrieren können. Die dadurch resultierende schnelle Clearance aus dem Blut führt bereits kurze Zeit nach Peptidgabe zu hohen Signalrauschverhältnissen (Behr et al., 2001; Gotthardt, Boermann, 2004). Dies ist mit einem so großen Molekül wie einem Antikörper nicht möglich. Aus diesen Gründen wurde versucht, die positiven Ergebnisse mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper auf die kleineren F(ab')₂ (100 kD)-, und noch kleineren F(ab')-Fragmente (48 kD) zu übertragen.

3.3.1. Herstellen der F(ab')₂ – Fragmente von Herceptin®

Die F(ab')₂-Fragmente wurden, wie im Methodenteil beschrieben, durch Spaltung des Antikörpers mit immobilisiertem Pepsin gewonnen.



NT112112.DATA [PCAD Channel 2]

Index	Name	Start	Time	End	Ret. time Offset	Quantity	Height	Area	Area %
		[Min]	[Min]	[Min]	[Min]	[% Area]	[μAU]	[μAU.Min]	[%]
1	F(ab') ₂	7,26	7,64	8,48	0,00	97,33	258690,2	120027,4	97,335
2	Bruchstücke	9,86	10,15	10,63	0,00	2,67	8751,8	3286,7	2,665
Total						100,00	267442,0	123314,1	100,000

Abb. 3.25: Präparation der F(ab')₂-Fragmente von Herceptin® durch Pepsinverdau, gezeigt ist der UV-Vis-Kanal 2 (280 nm).

Abb. 3.25 zeigt eine Kontrolle der Antiköperspaltung nach ungefähr 3 h Reaktionszeit. Es findet sich der Herceptin®-Peak bei 7,2 min und der F(ab')₂-Peak bei 7,6 min. Das nachfolgend gezeigte Diagramm zeigt die Reaktion nach vollständiger Abspaltung des Fc-Fragments, von diesem sind nur noch Bruchstücke erhalten, erkennbar an dem Peak bei 10,15 min. Die Bruchstücke wurden von den F(ab')₂-Fragmenten durch wiederholte Diafiltration mit einem 30 kD Zentrifugenfilter getrennt.

3. Ergebnisse

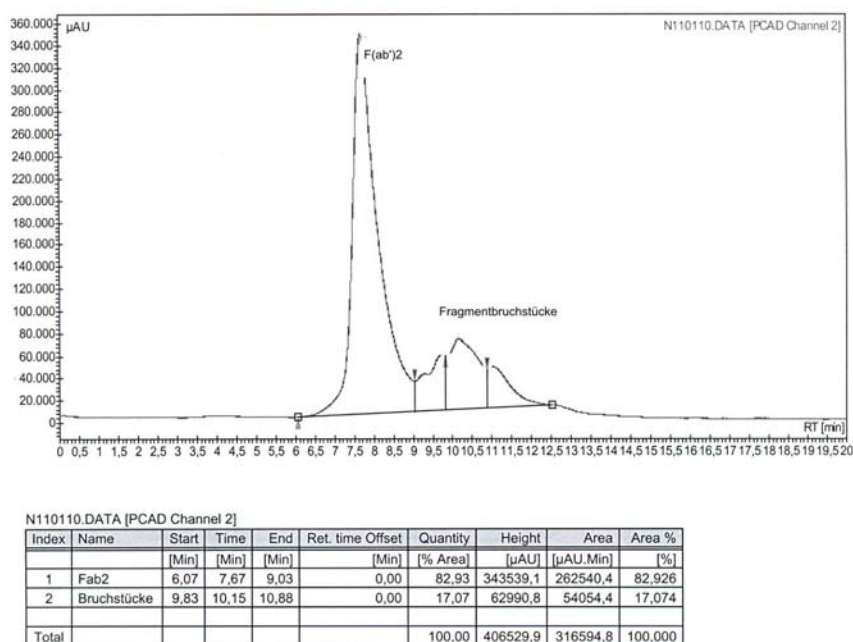


Abb. 3.26: Herceptin® ist vollständig in $F(ab')_2$ -Fragmente gespalten worden, vom Fc-Fragment sind nur noch Fragmentbruchstücke vorhanden, gezeigt ist der UV-Vis-Kanal2 (280 nm).

3.3.2. Synthese von $Cy5.5-F(ab')_2$

Die beiden nachfolgend gezeigten HPLC-Diagramme zeigen die im Methodenteil beschriebene Synthese von $Cy5.5-F(ab')_2$ im Reaktionsablauf und nach der Aufreinigung durch Diafiltration. Der Produktpeak ist an den simultanen Peaks bei 674 nm und 280 nm bei 7,4 min zu erkennen. Ferner sind in Abb. 3.27 der HOBt-Peak bei 13,2 min und der Cy5.5-Peak bei 12,2 min (674 nm) zu sehen.

3. Ergebnisse

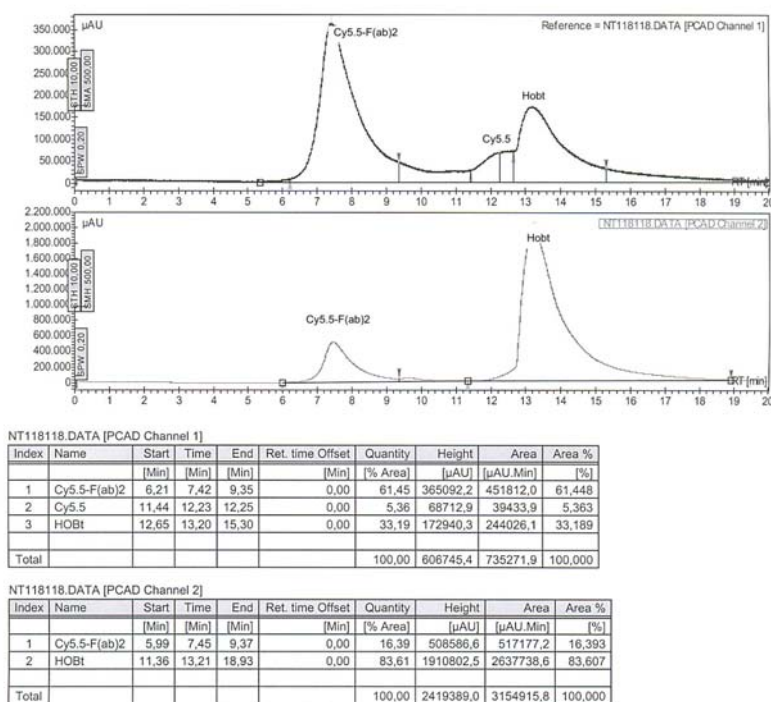


Abb. 3.27: Kontrolle des Reaktionsablaufs der Synthese von Cy5.5-F(ab')₂, oben UV-Vis-Kanal1 (674 nm), unten UV-Vis-Kanal2 (280 nm).

3. Ergebnisse

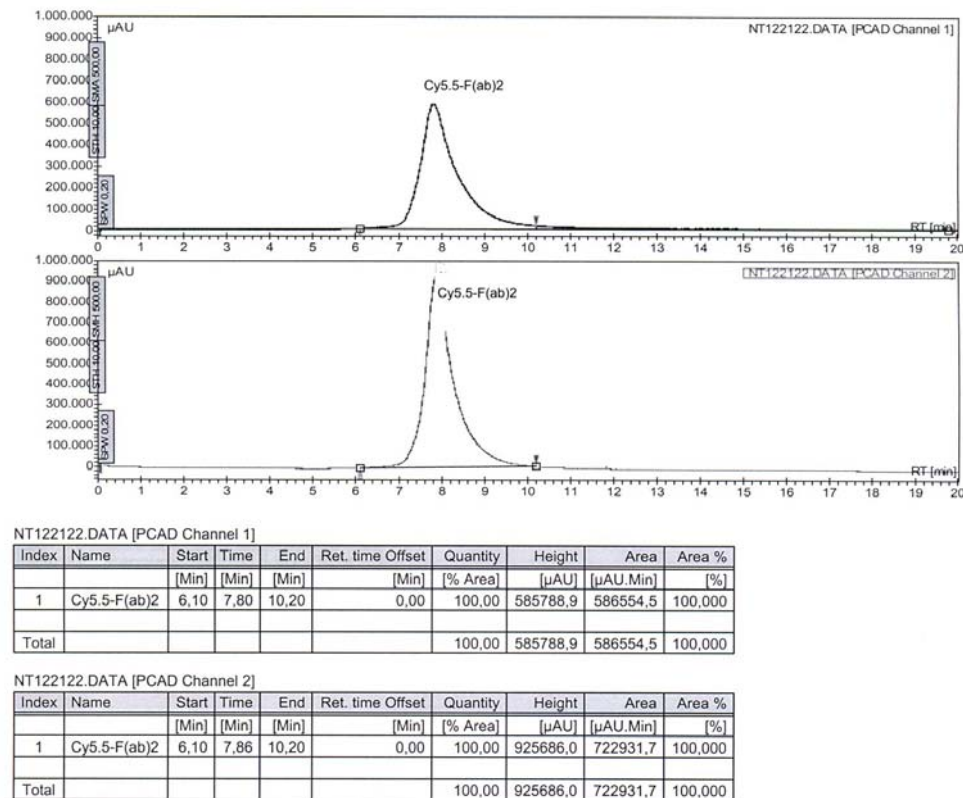


Abb. 3.28: Cy5.5-F(ab')₂-Fragmente nach der Aufreinigung, oben UV-Vis-Kanal1 (674 nm), unten UV-Vis-Kanal2 (280 nm).

3.3.3. Bindungsstudie mit Cy5.5-F(ab')₂

Die Verdrängungsstudien zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes von Cy5.5-F(ab')₂ wurden zu einen mit ¹¹¹In-Herceptin® und zum anderen mit ¹¹¹In-F(ab')₂ als Blocksubstanz durchgeführt.

3. Ergebnisse

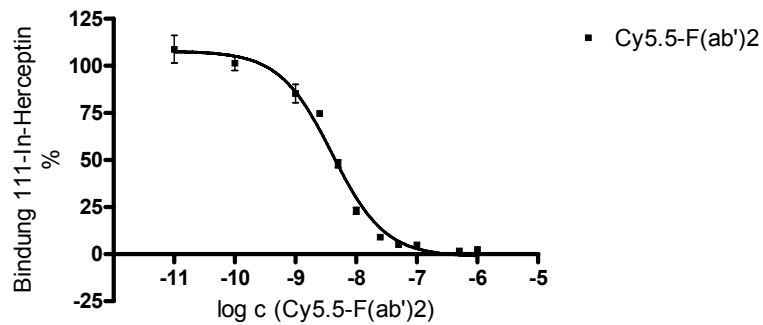


Abb. 3.29: Darstellung der Bindungsstudie von Cy5.5-F(ab')₂ zum ErbB/Her2-Rezeptor.

Abb. 3.29 zeigt die Bindungsstudie von Cy5.5-F(ab')₂ mit ¹¹¹In-Herceptin® als Blocksubstanz. Es wurden Verdrängungskonzentrationen von Cy5.5-F(ab')₂ zwischen 10⁻¹¹ und 10⁻⁶ mol/l eingesetzt.

Der IC₅₀-Wert beträgt $4.02 \cdot 10^{-9} \pm 1.61 \cdot 10^{-10}$ mol/l. Die unspezifische Bindung betrug circa 2 %.

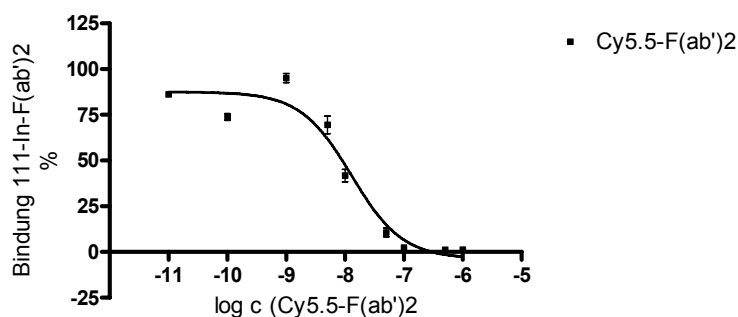


Abb. 3.30: Darstellung der Bindungsaffinität von Cy5.5-F(ab')₂ zum ErbB/Her2-Rezeptor im Vgl. zu ¹¹¹In-F(ab')₂.

Die Bindungsstudie von Cy5.5-F(ab')₂ mit ¹¹¹In-F(ab')₂ als Blocksubstanz ist oben dargestellt. Die Verdrängungskonzentrationen von Cy5.5-F(ab')₂ lagen zwischen 10⁻¹¹ und 10⁻⁶ mol/l. Der IC₅₀ wurde mit $1.28 \cdot 10^{-8} \pm 1.19 \cdot 10^{-9}$ mol/l ermittelt. Die unspezifische Bindung lag um 1,5 %.

3.3.4. Mikroskopie $F(ab')_2$ – Fragmente von Herceptin®

Für die konfokalen Fluoreszenzversuche wurden die SKOV3-Zellen mit etwa 70 µg $Cy5.5-F(ab')_2$ inkubiert.

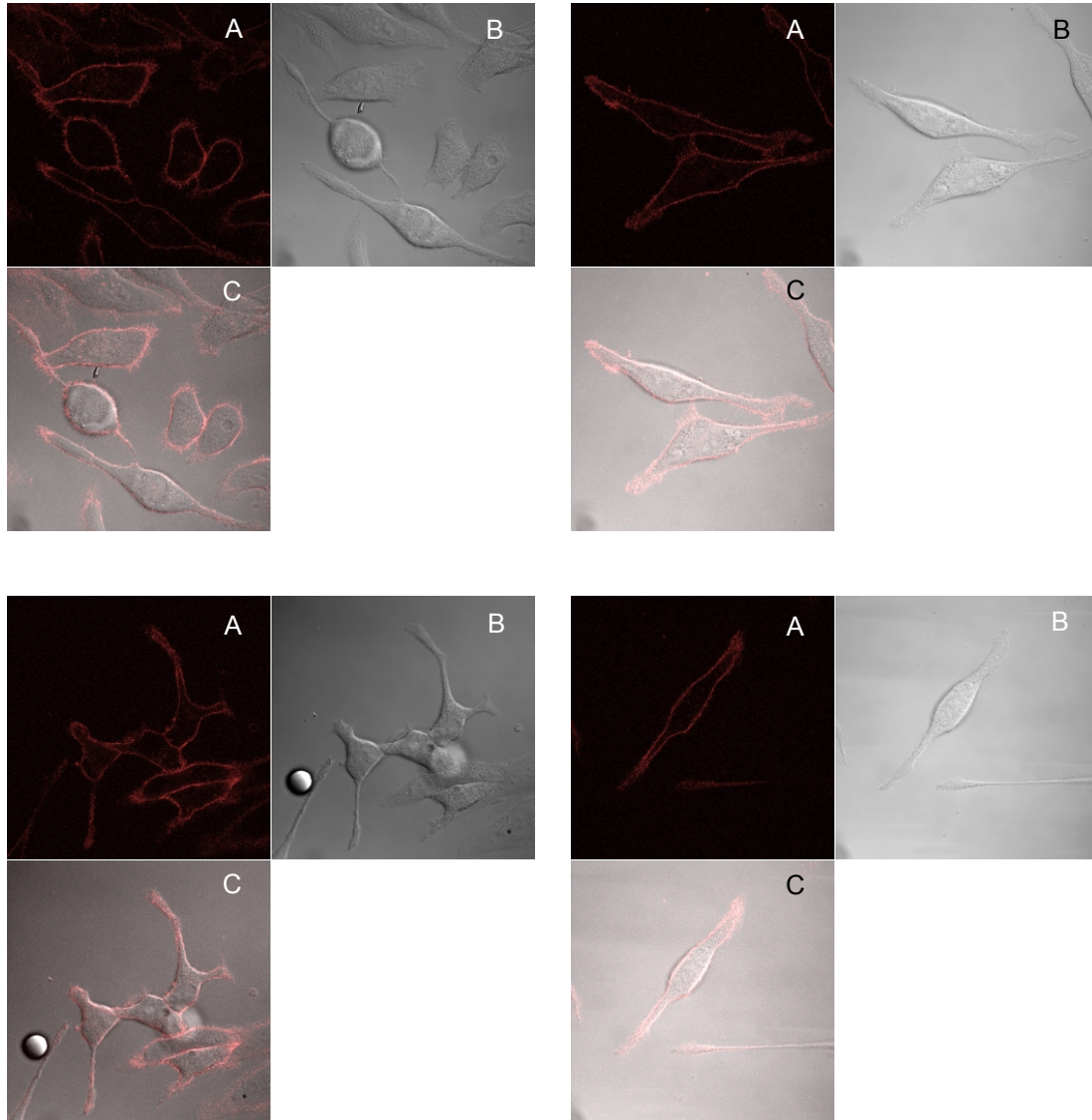


Abb. 3.31: SKOV3-Zellen nach 30 min Inkubation mit $Cy5.5-F(ab')_2$ -Fragmenten, Fluoreszenzbild (A), Nativbild (B), fusioniertes Bild (C).

Auch hier ist wie nach der Inkubation mit $Cy5.5-Herceptin^®$ nach 30 min eine Anlagerung des fluoreszenzmarkierten Liganden an die Zellmembranen zu beobachten.

3. Ergebnisse

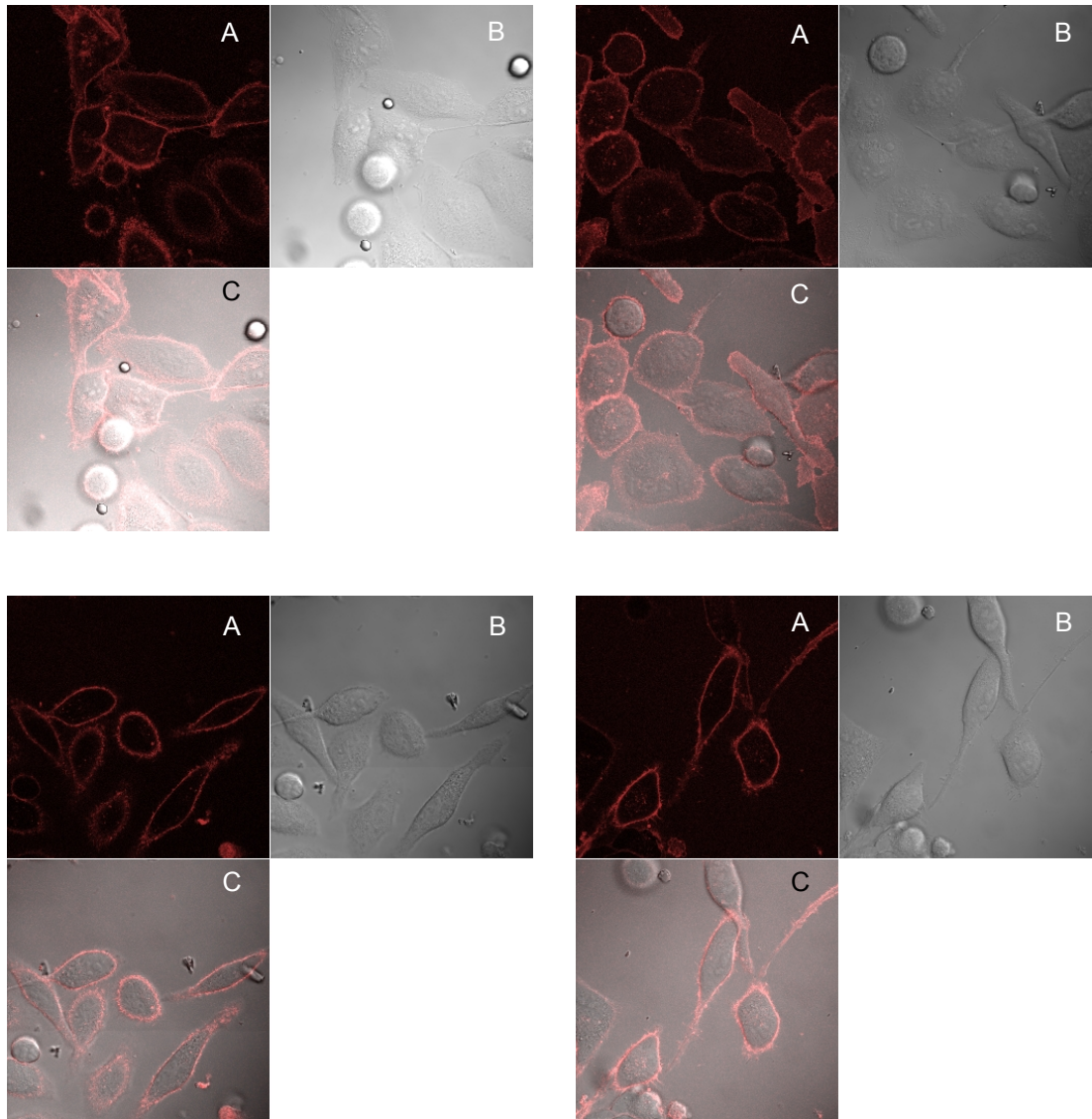


Abb. 3.32: SKOV3-Zellen nach 120 min Inkubation mit Cy5.5-F(ab')₂-Fragmenten. Fluoreszenzbild (links oben), Nativbild (rechts oben), fusioniertes Bild (links unten).

Nach 2 h Inkubationszeit hat sich das Signal an den Zellmembranen und Zellausläufern verstärkt, innerhalb der Zellen findet sich keinerlei Fluoreszenz.

3. Ergebnisse

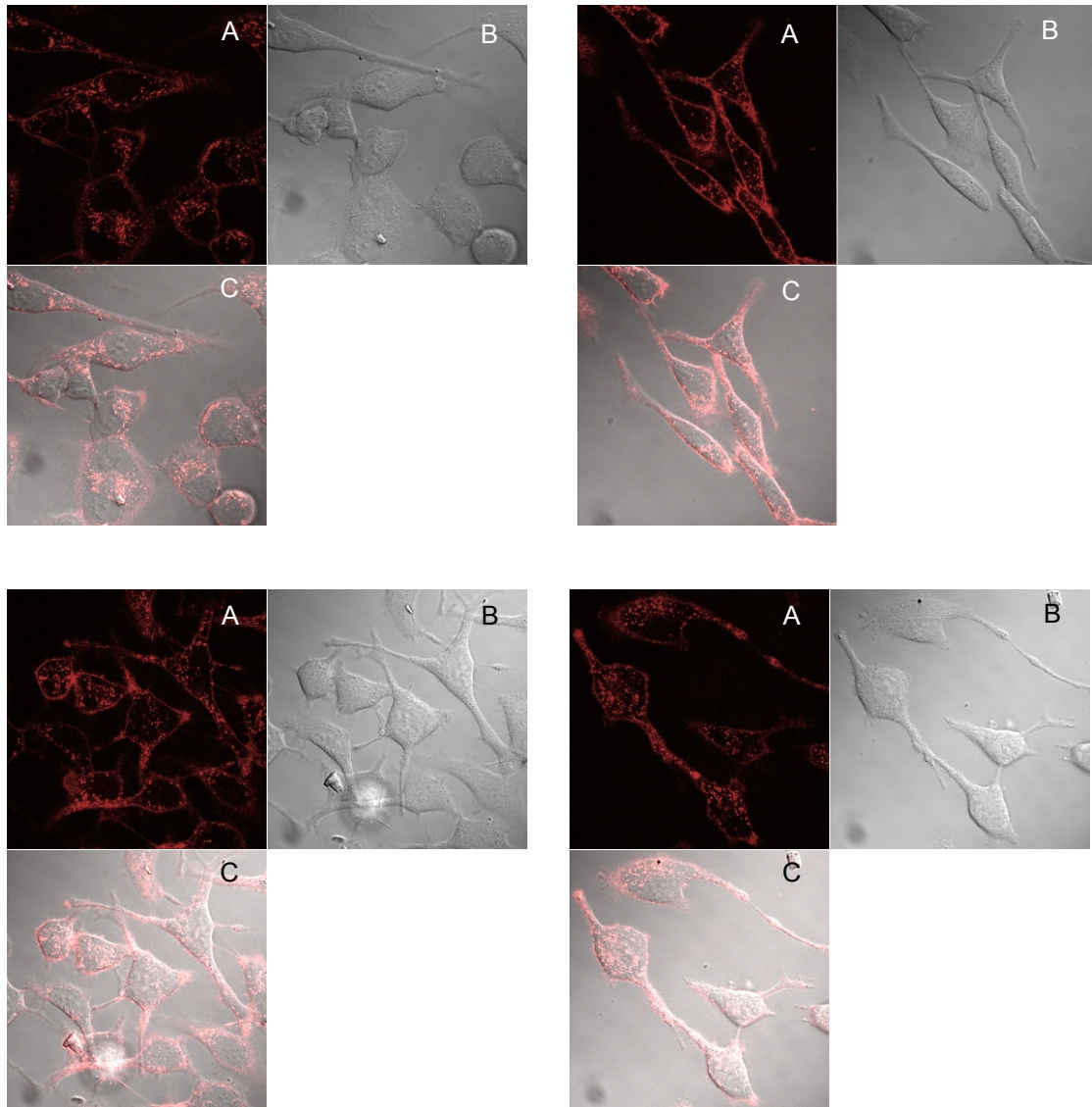


Abb. 3.33: SKOV3-Zellen nach 9 h Inkubation mit Cy5.5-F(ab')₂-Fragmenten. Fluoreszenzbild (A), Nativbild (B), fusioniertes Bild (C).

Nach 9 h Inkubation mit Cy5.5-F(ab')₂-Fragmenten aus finden sich als Zeichen der Internalisierung bei allen beobachteten SKOV3-Zellen deutliche Fluoreszenz im Zytoplasma der Zellen.

3.3.5. Tierversuche mit Cy5.5-F(ab')₂-Fragmenten von Herceptin®

Die *in vivo* Bildgebung des ErbB/Her2-Rezeptors mit Cy5.5-F(ab')₂ erfolgte mit dem *fluorescence-reflectance-imaging* (FRI)- System 1, 4, 24, 48 und 72 h nach Injektion von 70 µg Cy5.5-F(ab')₂.

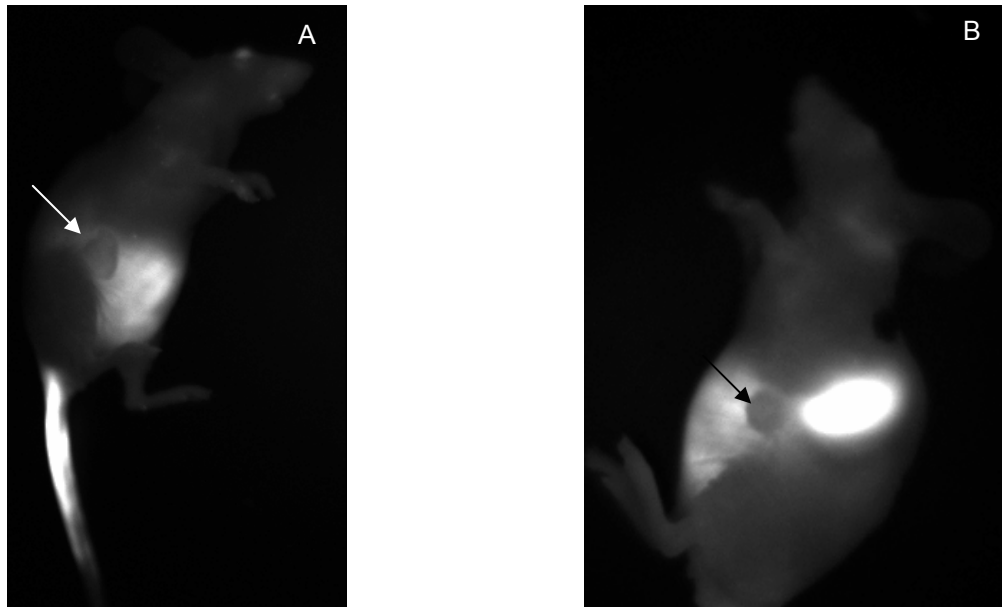


Abb. 3.34: Nacktmäuse (n = 3) 30-60 min nach Injektion von Cy5.5-F(ab')₂, Fluoreszenzbilder (A,B). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.

Eine Stunde nach der Injektion fand sich eine diffuse Fluoreszenz im Abdomen, eine starke Anreicherung in der Milz und im Schwanzbereich, sowie eine leichte Fluoreszenz im rezeptorpositiven Tumor, wie bei der Auswertung der mittleren Intensitäten ebenfalls zu sehen ist.

3. Ergebnisse

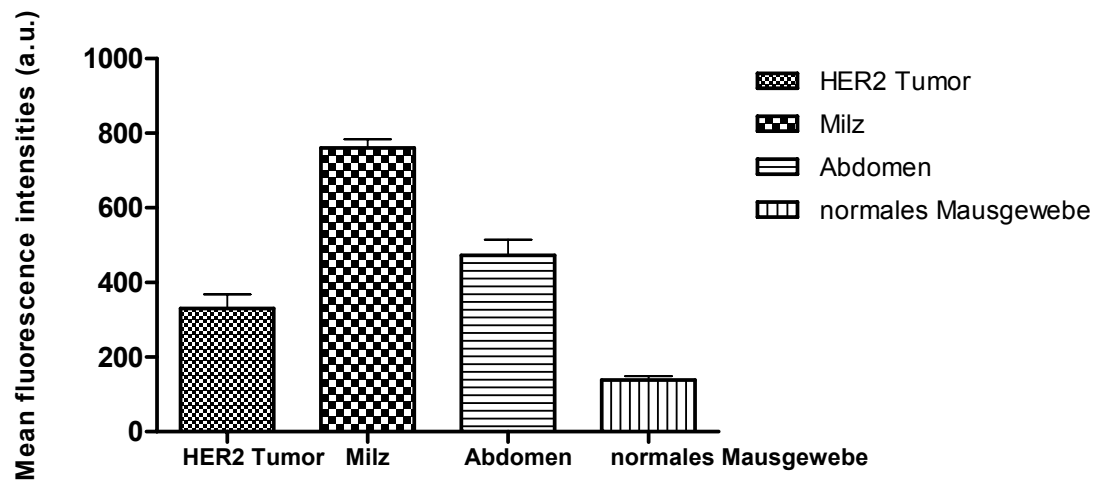


Abb. 3.35: Mittlere Fluoreszenzintensitäten 30-60 min nach Injektion von Cy5.5-F(ab')₂, Starke Fluoreszenz in der Milz und Abdomen im Vergleich dazu nur schwache Fluoreszenz im Bereich des Tumors.

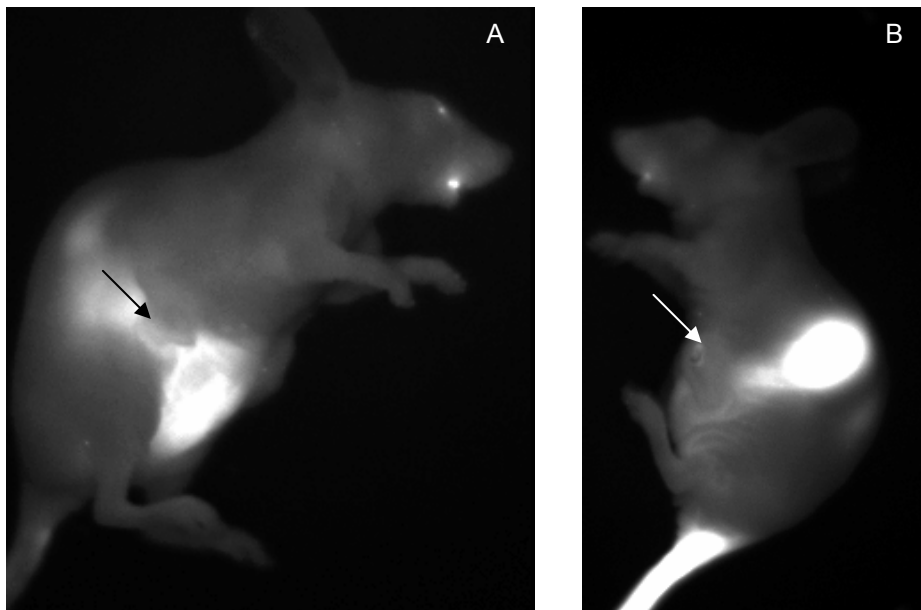


Abb. 3.36: Nacktmäuse (n = 3) 4 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab')₂, Fluoreszenzbilder (A,B). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.

3. Ergebnisse

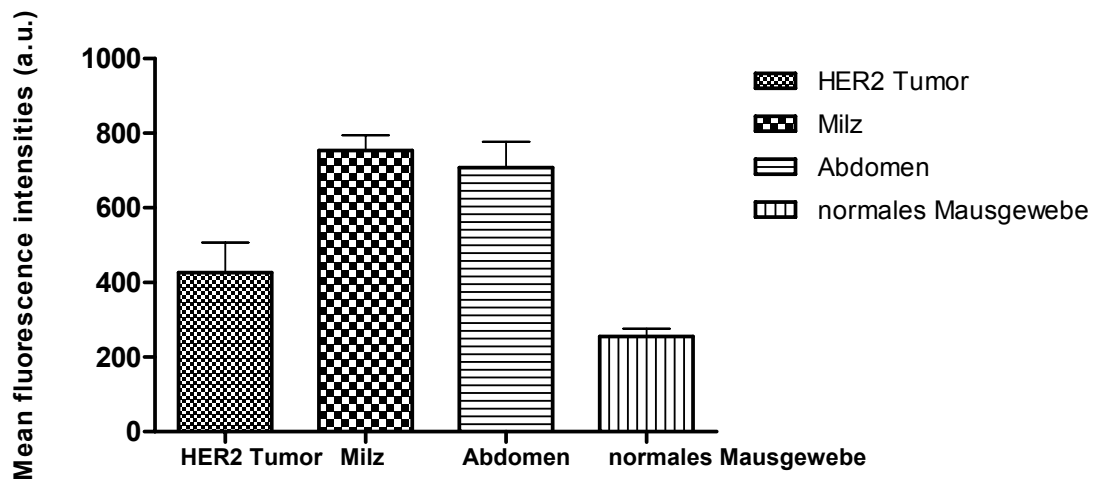


Abb. 3.37: Mittlere Fluoreszenzintensitäten 4h nach Injektion von Cy5.5-F(ab')₂, Starke Fluoreszenz in der Milz und Abdomen im Vergleich dazu nur schwache Fluoreszenz im Bereich des Tumors.

Nach 4 h sind starke Signale in Leber und Milz zu beobachten. Der Tumor zeigt im relativ zu Milz und Leber nur eine sehr geringe Fluoreszenz. Weil ein Teil der fluoreszenzmarkierten F(ab')₂-Fragmente in die Schwanzvene *para* injiziert wurden, findet sich starke Fluoreszenz im Schwanzbereich.

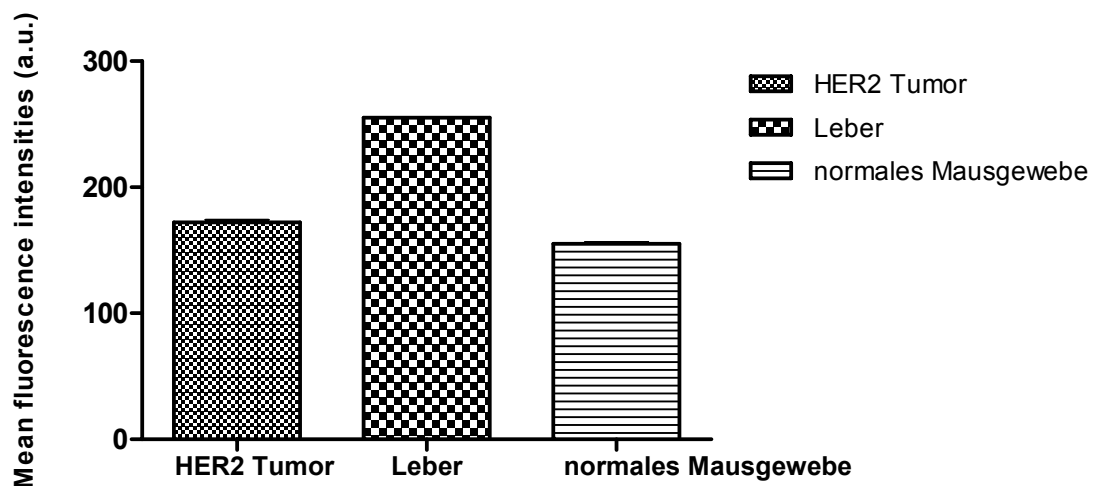


Abb. 3.38: Mittlere Fluoreszenzintensitäten 24h nach Injektion von Cy5.5-F(ab')₂, Kaum ein Unterschied zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe ohne Fluoreszenz.

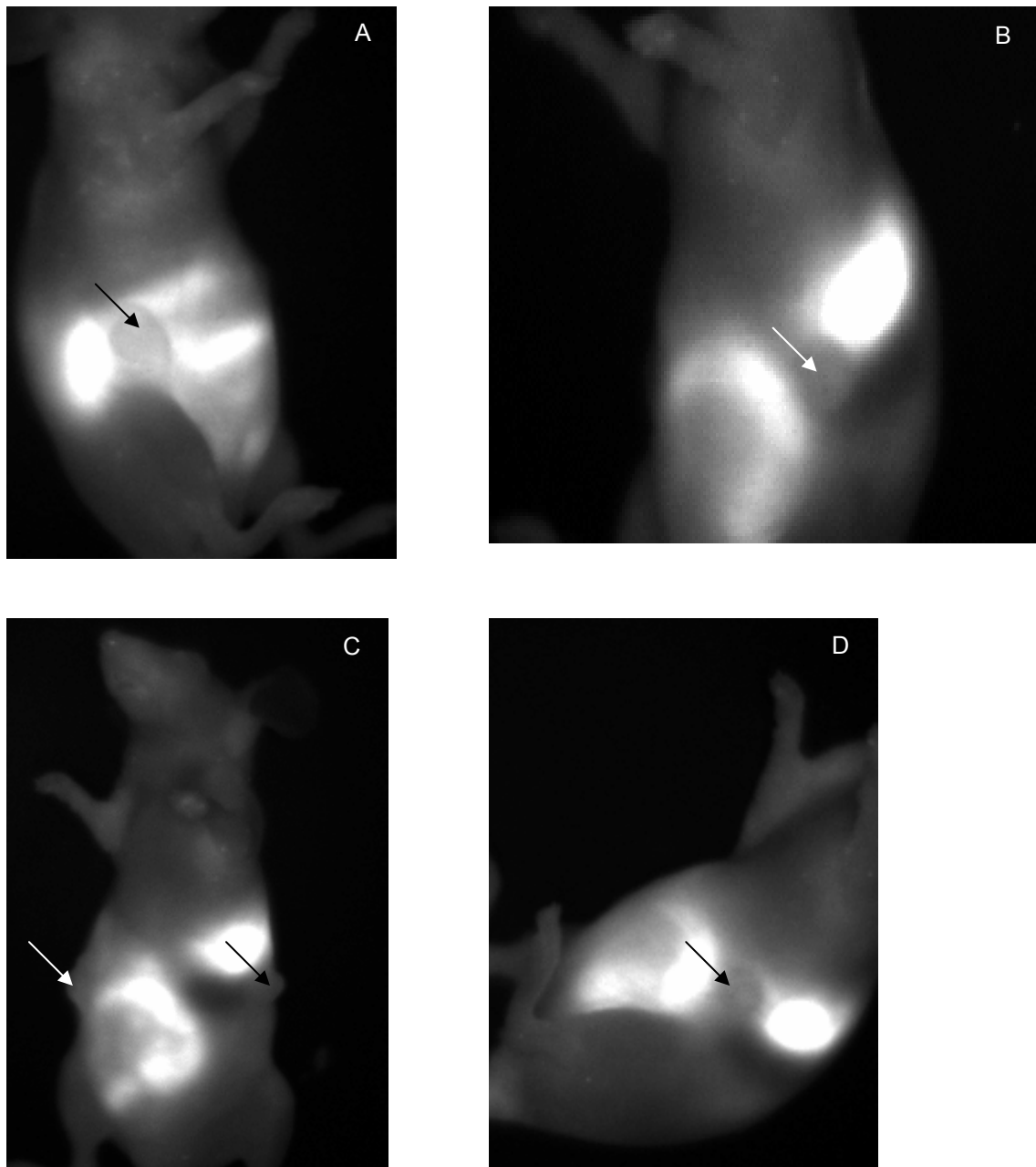


Abb. 3.39: Nacktmäuse (n = 3) 21-24 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab')₂, Fluoreszenzbilder (A-D). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.

24 h nach Injektion findet sich kein wesentlicher Fluoreszenzintensitätsunterschied zwischen Tumor und Referenzgewebe, weiter deutliche Fluoreszenz in Milz und Leber. Dasselbe gilt für die Bilder nach 48 und 72 h.

3. Ergebnisse

Zu diesen Zeitpunkten ist das Signalrauschverhältnis jedoch schon recht ungünstig, so dass keine kontrastreichen Bilder zu gewinnen waren.

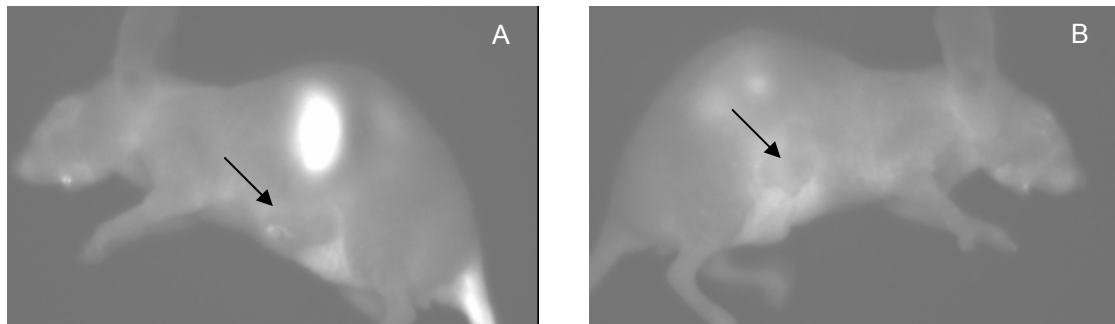


Abb. 3.40: 48 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab')₂ (n = 3), Fluoreszenzbilder (A,B). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.

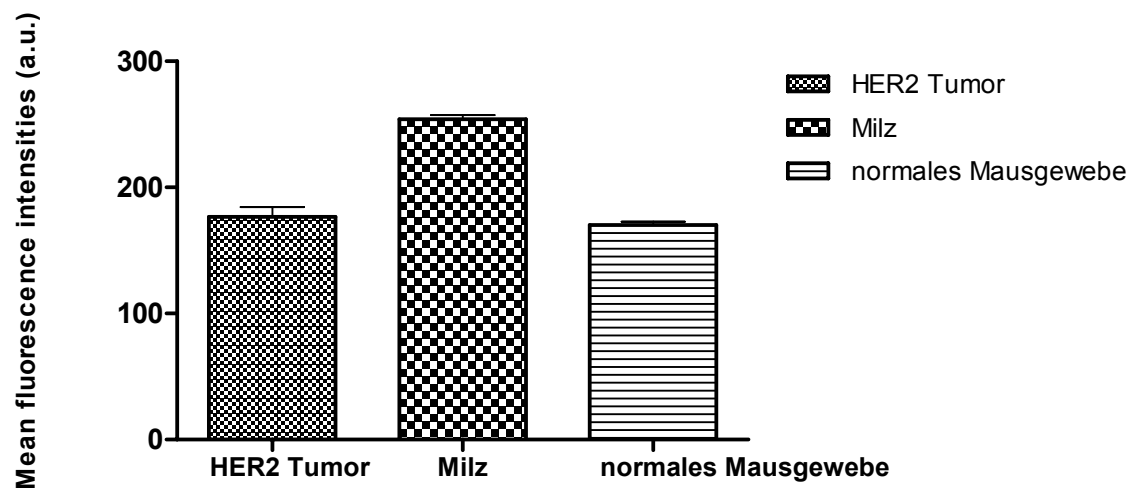


Abb. 3.41: Mittlere Fluoreszenzintensitäten 48 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab')₂. Kein Unterschied zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe ohne Fluoreszenz.

3. Ergebnisse

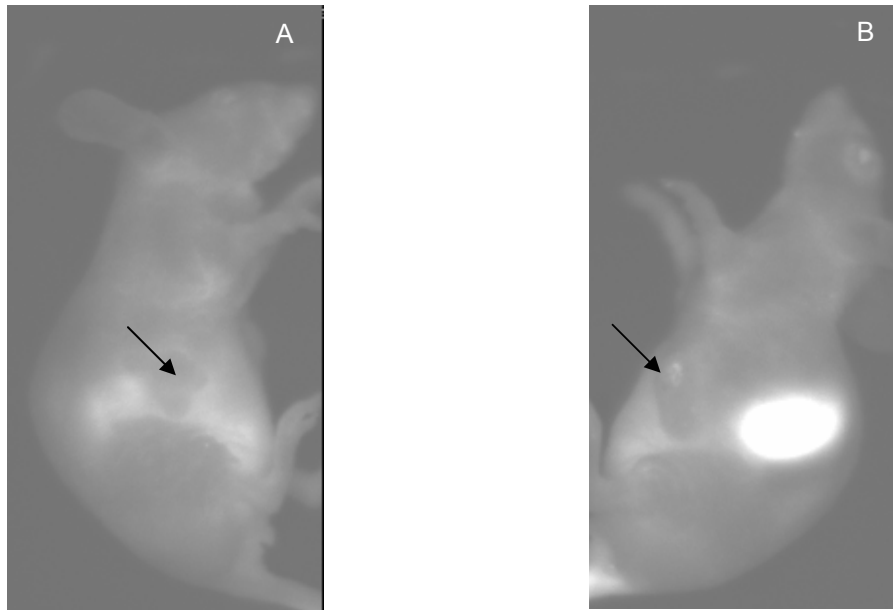


Abb. 3.42: 72 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab')₂ (n = 3), Fluoreszenzbilder (A-B). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.

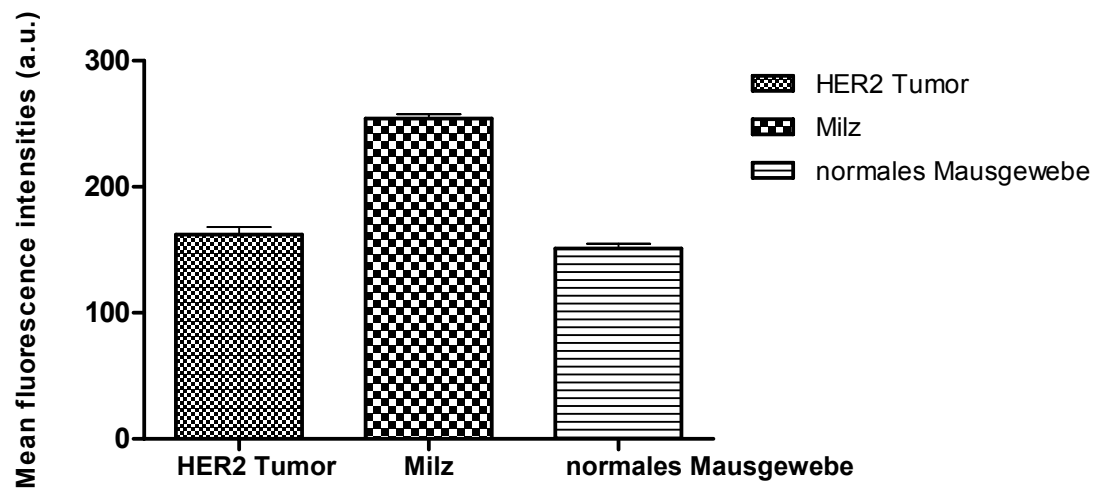


Abb. 3.43: Mittlere Fluoreszenzintensitäten 72 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab')₂. Kein Unterschied zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe ohne Fluoreszenz.

3.4.1. Herstellen der F(ab')-Fragmente von Herceptin®

Abb. 3.44 zeigt die Verlaufskontrolle der im Methodenteil bereits beschriebenen Spaltung der F(ab')₂-Fragmente von Herceptin® in F(ab')-Fragmente. Die dabei entstehenden Fragmentbruchstücke zeigen sich in einem HPLC-Peak bei 9,95 min. Der restliche Anteil an F(ab')₂-Fragment ist an einem kleinen Peak bei einer Retentionszeit von 7,65 min zu erkennen. Der F(ab')-Fragmentpeak ist bei 8,46 min zu sehen.

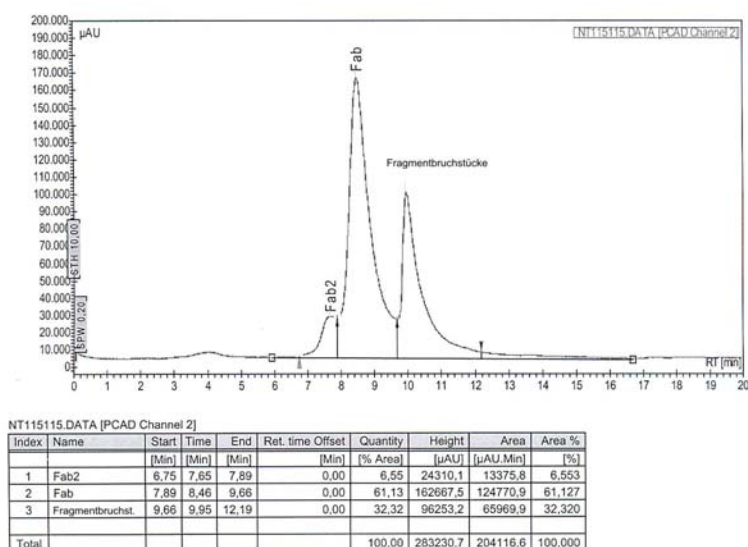


Abb. 3.44: Verlaufskontrolle der Spaltung der F(ab')₂-Fragmente in F(ab')-Fragmente, gezeigt ist der UV-Vis-Kanal2 (280 nm).

3. Ergebnisse

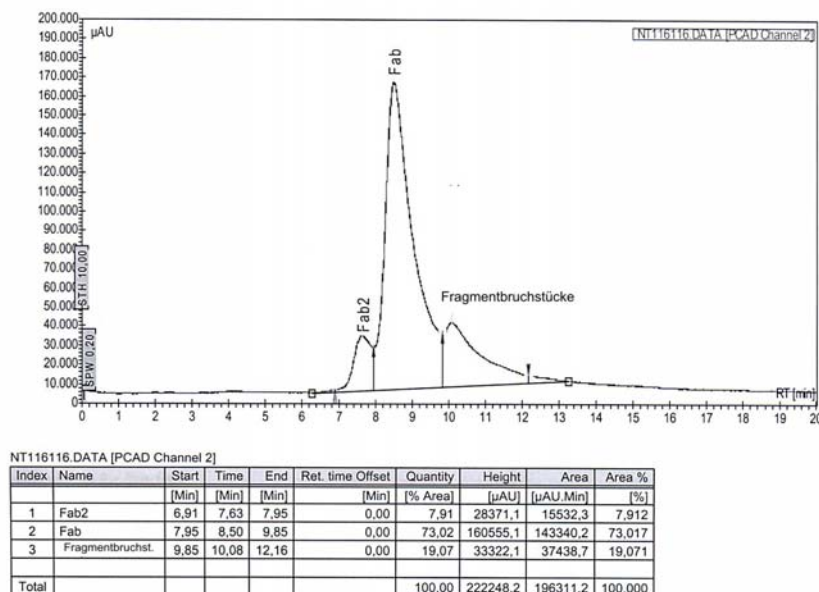


Abb. 3.45: F(ab')-Fragmente nach Filtration, gezeigt ist der UV-Vis-Kanal2 (280 nm).

Nach der Filtration sind in der HPLC-Kontrolle noch geringe Mengen an Fragmentbruchstücken bei 10 min, sowie F(ab')₂-Fragment zu sehen. Das F(ab')₂-Fragment bei 7,63 min, lässt sich aufgrund seiner Größe nicht durch Diafiltration von den F(ab')-Fragmenten, bei 8,5 min trennen. Es ist hier auf einen möglichst vollständigen Umsatz der Reaktion zu achten.

3.4.2. Synthese Cy5.5-F(ab')- Fragmente

Das eben beschriebene Problem der Entfernung der F(ab')₂-Fragmente spielt auch nachfolgend eine Rolle. Die Verlaufskontrolle der Synthese von Cy5.5-F(ab') zeigt, dass bei der Reaktion aufgrund des Gemisches von F(ab')₂ und F(ab')-Fragmenten sowohl Cy5.5-F(ab') bei 8 min, als auch, wenn auch in deutlich geringerer Konzentration, Cy5.5-F(ab')₂, bei 7,3 min entstanden ist.

3. Ergebnisse

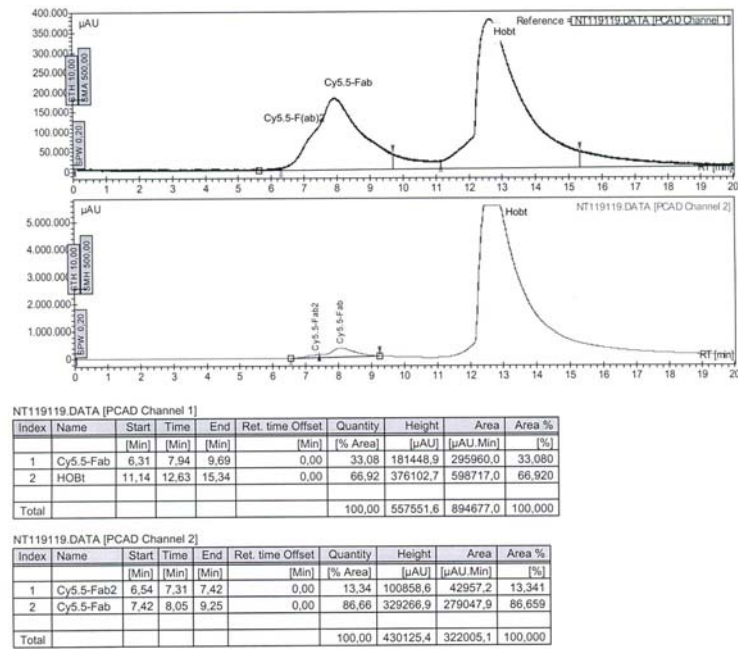


Abb. 3.46: Verlaufskontrolle der Synthese von Cy5.5-F(ab')-Fragment von Herceptin®, oben UV-Vis-Kanal1 (674 nm), unten UV-Vis-Kanal2 (280 nm).

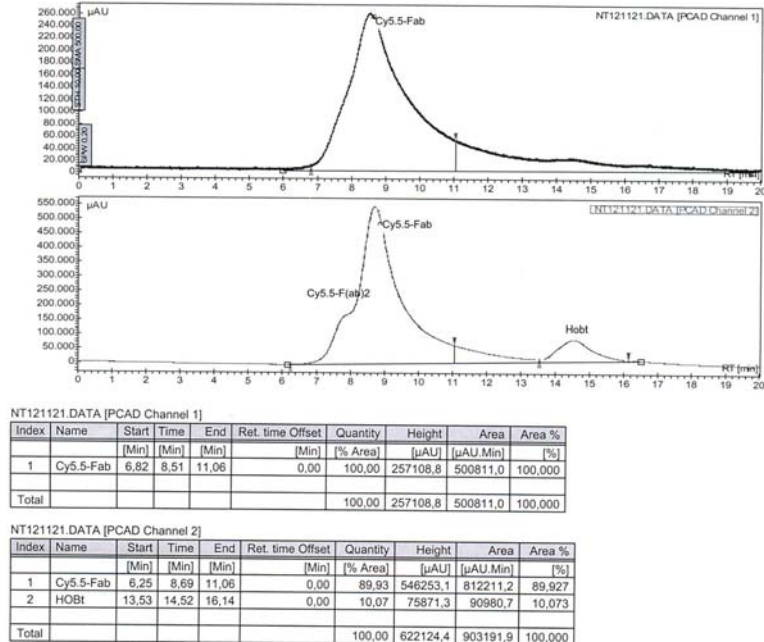


Abb. 3.47: Cy5.5-F(ab') nach der Filtration, oben UV-Vis-Kanal1 (674 nm), unten UV-Vis-Kanal2 (280 nm).

3.4.3. Bindungsversuche Cy5.5-F(ab')- Fragmente

Die Verdrängungsbindungsstudie mit dem Cy5.5-F(ab')-Fragment von Herceptin® wurde sowohl mit ^{111}In -Herceptin® als auch mit ^{111}In -F(ab') als Blocksubstanz durchgeführt.

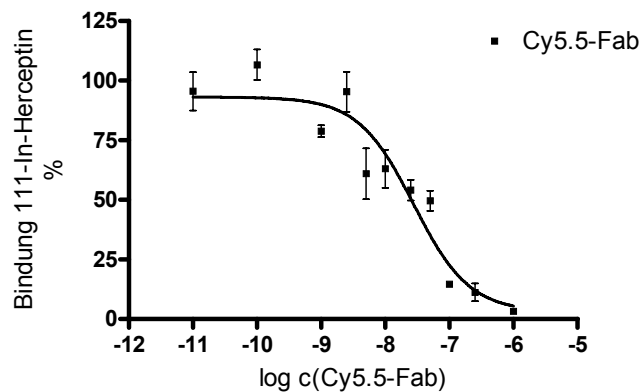


Abb. 3.48: Darstellung der Bindungsaffinität von Cy5.5-F(ab') zum Her2-Rezeptor.

Abb. 3.48 zeigt die Studie mit ^{111}In -Herceptin® als Blocksubstanz. Es wurden Verdrängungskonzentrationen an Cy5.5-F(ab') zwischen 10^{-11} - 10^{-6} mol/l eingesetzt. Der ermittelte IC_{50} liegt bei $2.77 \cdot 10^{-8} \pm 3.96 \cdot 10^{-9}$ mol/l. Die unspezifische Bindung lag bei 3,5 %.

3. Ergebnisse

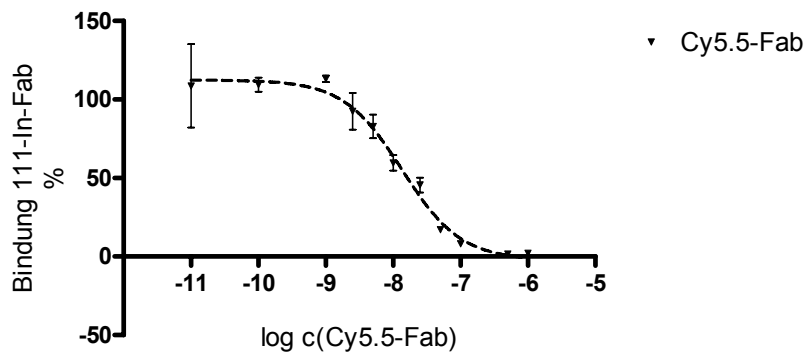


Abb. 3.49: Darstellung der Bindungsaffinität von Cy5.5-F(ab') zum Her2-Rezeptor verglichen mit ^{111}In -F(ab')-Fragment.

Die oben stehende Abbildung 3.49 zeigt die Verdrängungsstudie mit ^{111}In -F(ab') als Blocksubstanz. Es wurden Verdrängungskonzentrationen an Cy5.5-F(ab') von 10^{-11} - 10^{-6} mol/l eingesetzt. Die unspezifische Bindung lag bei etwa 2 %. Als IC_{50} wurde eine Konzentration an Cy5.5-F(ab') von $1.36 \cdot 10^{-8} \pm 1.5 \cdot 10^{-9}$ mol/l ermittelt. Den Vergleich der Bindungseigenschaften von Cy5.5-F(ab')₂ und Cy5.5-F(ab') zeigt die Abb. 3.50.

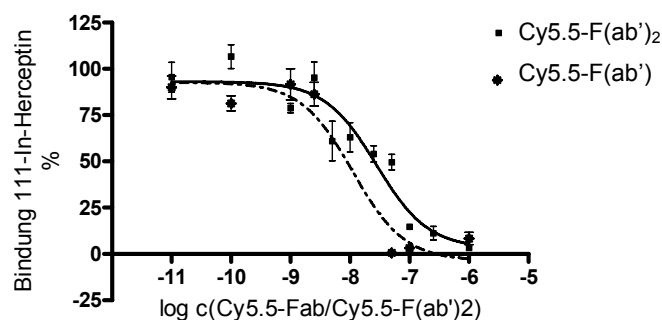


Abb. 3.50: Darstellung der Bindungsaffinitäten von Cy5.5-F(ab')₂ und Cy5.5-F(ab') im Vergleich.

Es zeigt sich, dass größere Konzentrationen an Cy5.5-F(ab') nötig sind, um 50 % an ^{111}In -Herceptin® vom ErbB/Her2-Rezeptor zu verdrängen, als an

3. Ergebnisse

Cy5.5-F(ab')₂. Cy5.5-F(ab')₂ hat somit eine stärkere Bindungsaffinität zum ErbB/Her2-Rezeptor.

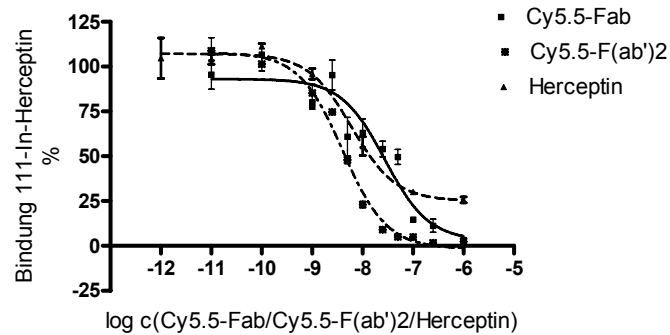


Abb. 3.51: Darstellung der Bindungsaffinitäten von Cy5.5-F(ab')₂, Cy5.5-F(ab') und Herceptin[®] im Vergleich

Blocksubstanz	Verdrängungssubstanz	IC ₅₀ [mol/l]
¹¹¹ In-Herceptin [®]	Herceptin [®]	6.15·10 ⁻⁹ ± 7.38·10 ⁻¹⁰
¹¹¹ In-Herceptin [®]	Cy5.5-Herceptin [®]	3.39·10 ⁻⁸ ± 5.66·10 ⁻⁹
¹¹¹ In-Herceptin [®]	Cy5.5-F(ab') ₂	4.02·10 ⁻⁹ ± 1.61·10 ⁻¹⁰
¹¹¹ In-Herceptin [®]	Cy5.5-F(ab')	2.77·10 ⁻⁸ ± 3.96·10 ⁻⁹
¹¹¹ In-HER-F(ab) ₂	Cy5.5-HER-F(ab') ₂	1.28·10 ⁻⁸ ± 1.19·10 ⁻⁹
¹¹¹ In-HER-F(ab)	Cy5.5-HER-F(ab')	1.36·10 ⁻⁸ ± 1.50·10 ⁻⁹

Tabelle 3.1: Übersicht über die ermittelten IC₅₀-Werte aus den Bindungsstudien

3.4.4. Konfokale Mikroskopie mit Cy5.5-F(ab')-Fragmenten von Herceptin®

Bei den konfokalen Mikroskopieversuchen wurden die ErbB/Her2-Rezeptor positiven Zellen SKOV3-Zellen mit etwa 70 µg Cy5.5-F(ab')-Fragmenten inkubiert.

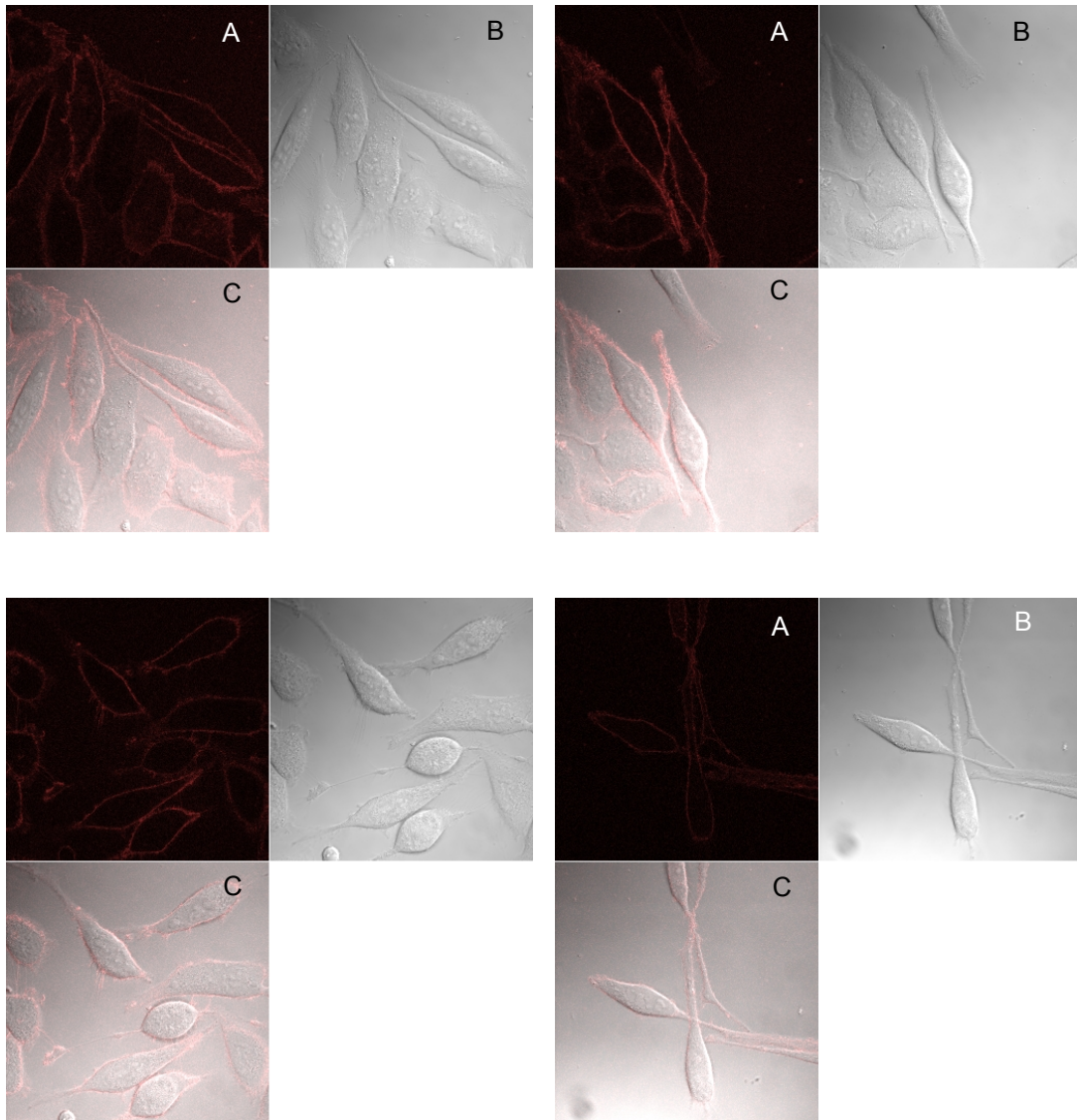


Abb. 3.52: SKOV3 Zellen nach 30 min Inkubation mit Cy5.5-F(ab')-Fragment. Fluoreszenzbild (A), Nativbild (B), fusioniertes Bild (C).

3. Ergebnisse

Es ist nach einer halben Stunde eine Anlagerung des Cy5.5 markierten F(ab')-Fragments an die Zellmembranen aller in der Schnittebene liegenden Zellen zu beobachten.

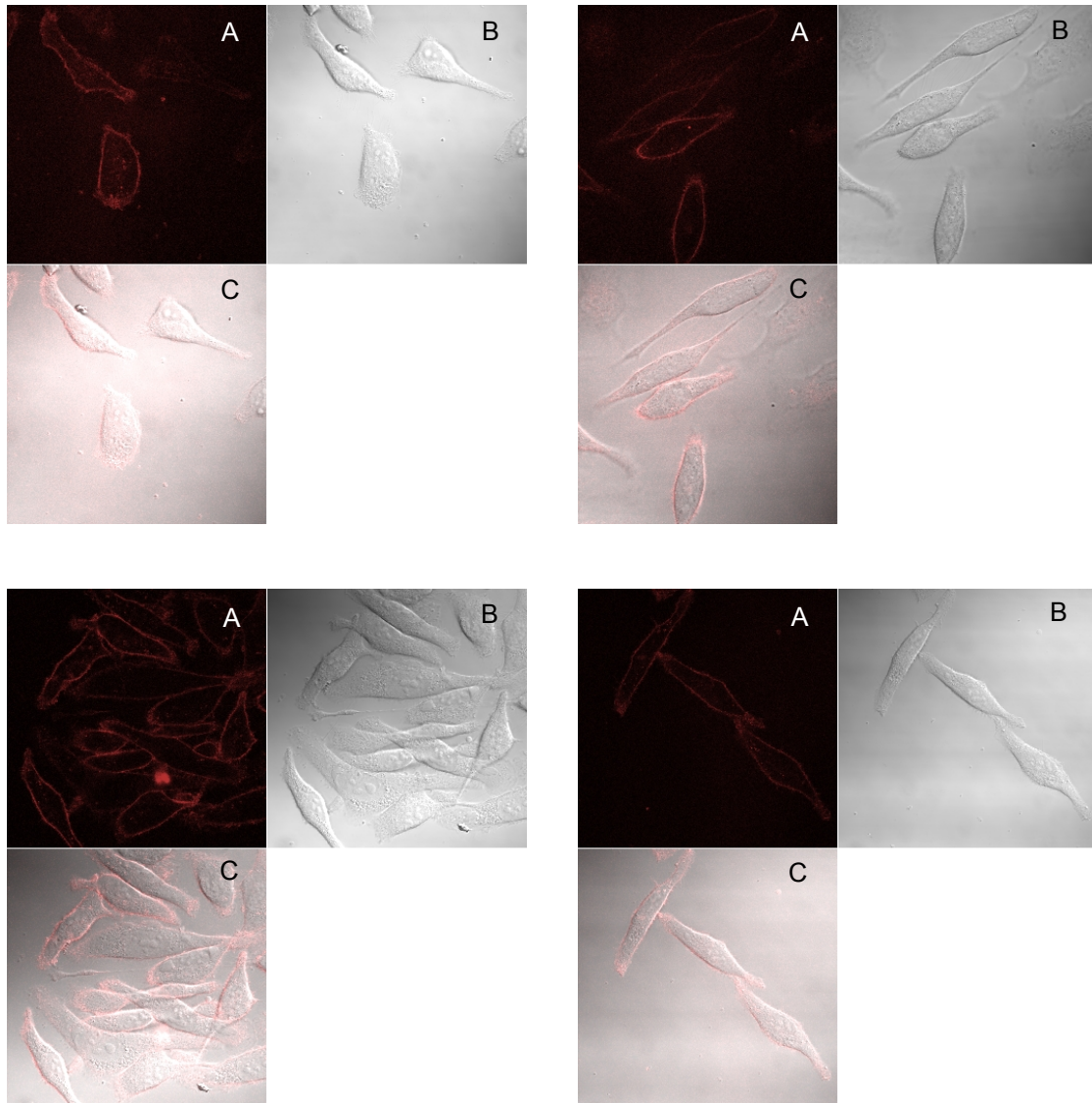


Abb. 3.53: SKOV3 Zellen nach 120 min Inkubation mit Cy5.5-F(ab')-Fragment. Fluoreszenzbild (A), Nativbild (B), fusioniertes Bild (C).

Das Fluoreszenzsignal an den Zellmembranen ist nach 2 h stärker geworden. In einzelnen Zellen ist im Zellinneren ein Fluoreszenzsignal wahrzunehmen.

3. Ergebnisse

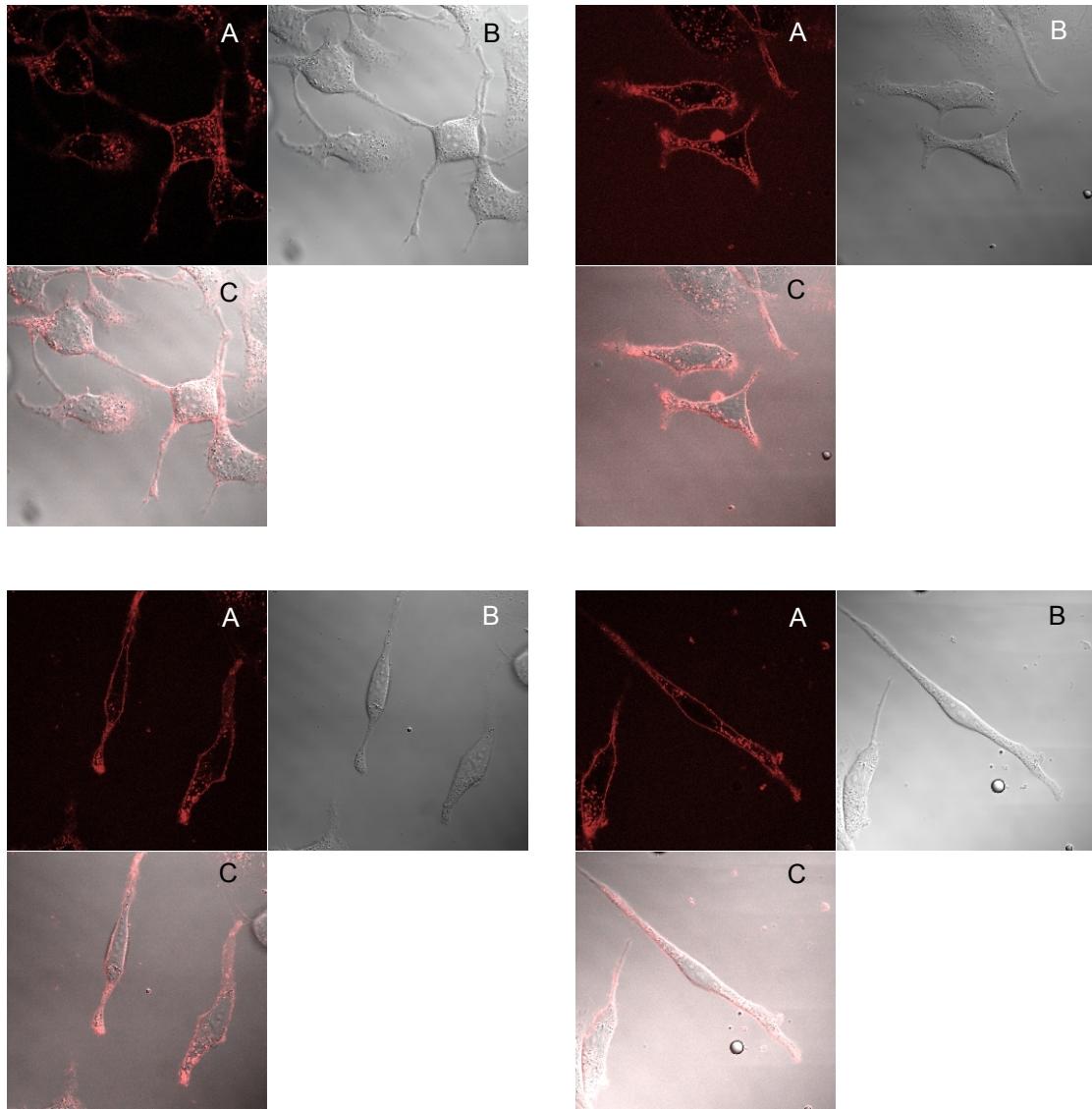


Abb. 3.54: SKOV3 Zellen nach 9 h Inkubation mit Cy5.5-F(ab')-Fragment. Fluoreszenzbild (A), Nativbild (B), fusioniertes Bild (C).

Nach 9 h hat sich das Fluoreszenzsignal an den Zellmembranen nochmals deutlich verstärkt und in den Zellen ist deutlich eine Aufnahme des Farbstoffs zu erkennen. Der Zellkern ist ausgespart, dennoch kann von einer Internalisierung des Cy5.5-F(ab')-Fragments gesprochen werden.

3.4.5. Tierversuche mit Cy5.5-F(ab')-Fragmenten von Herceptin®

Die *in vivo* Fluoreszenzbildgebung des ErbB/Her2-Rezeptors mit dem Rezeptorliganden Cy5.5-F(ab') erfolgte 4, 24, 48 und 72 h nach intravenöser Injektion von 70 µg Cy5.5-F(ab'). Das F(ab')-Fragment besitzt eine Molmasse von etwa 48 kD.

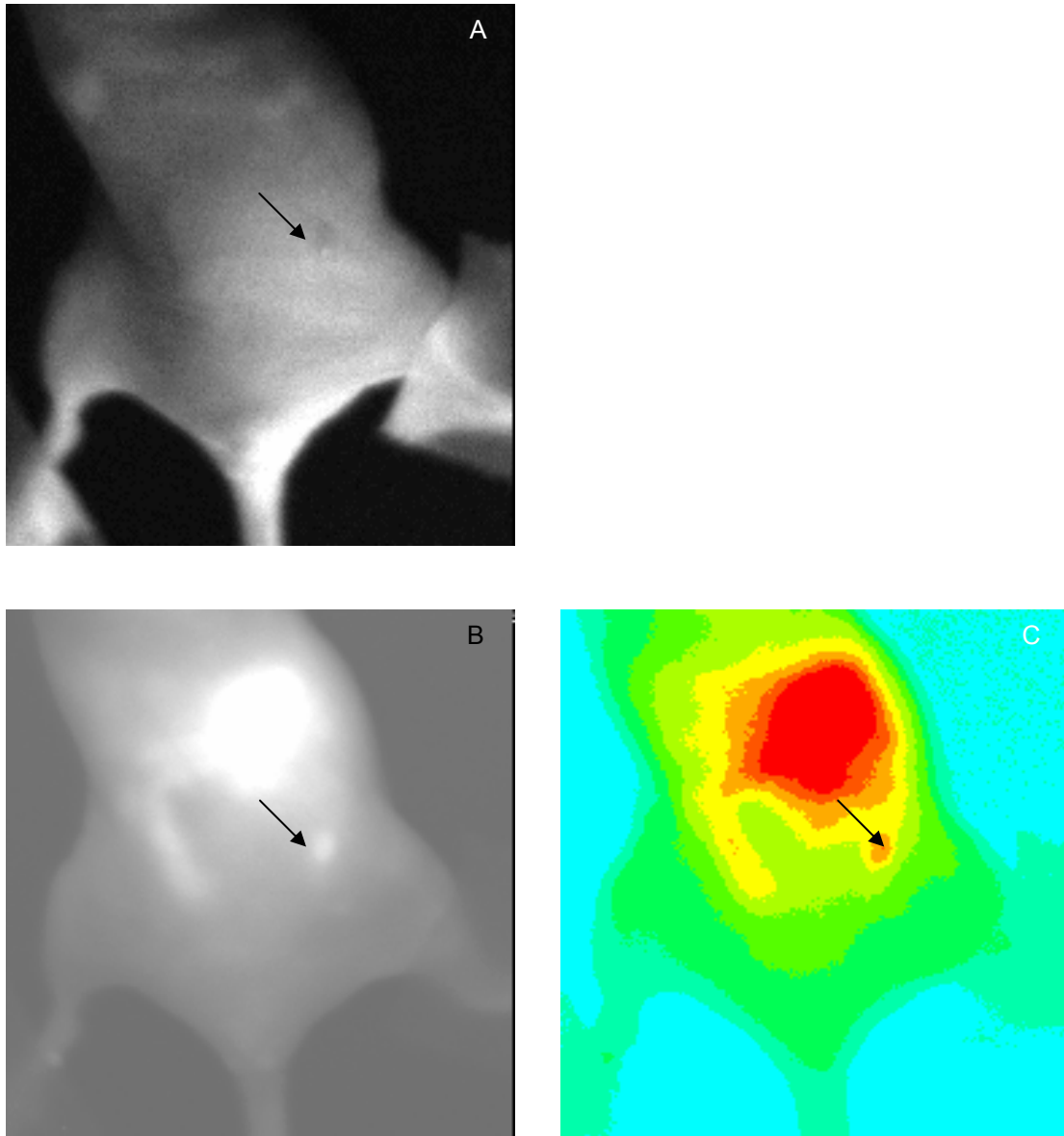


Abb. 3.55: Nacktmaus (n=3) 4 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab'): Nativbild (A), Fluoreszenzbild(B), farbkodiertes Schema (C). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.

3. Ergebnisse

Wie in dieser Abbildung zu sehen ist, ist der kleine ErbB/Her2-positive Tumor an der linken Flanke der Maus bereits nach 4 h darstellbar. Neben dem Tumor findet sich eine diffuse Fluoreszenz im Abdominalbereich der Maus.

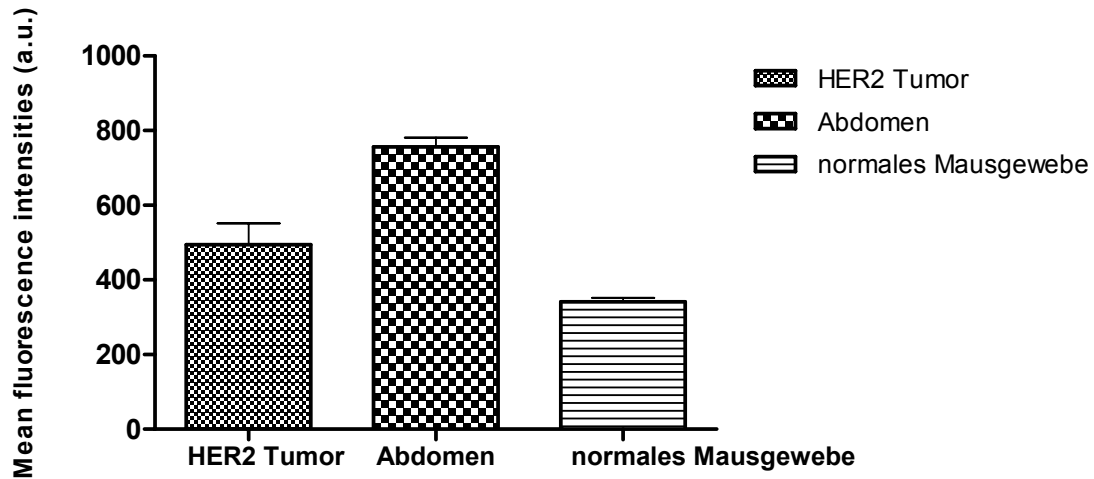


Abb. 3.56: Mittlere Fluoreszenzintensitäten 4 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab')-Fragment.

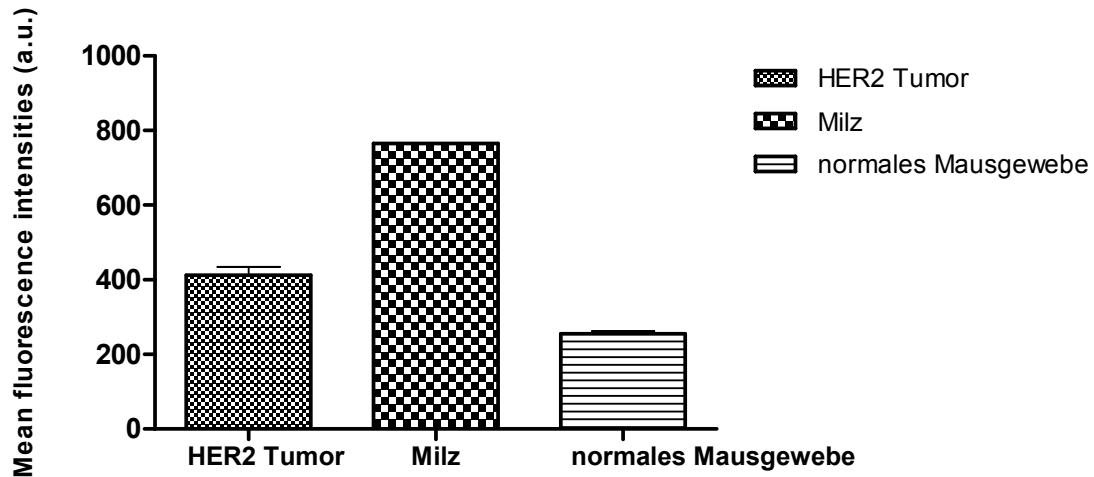


Abb. 3.57: Mittlere Fluoreszenzintensitäten 24 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab')-Fragment. Deutliches Fluoreszenzsignal in Milz und Tumor.

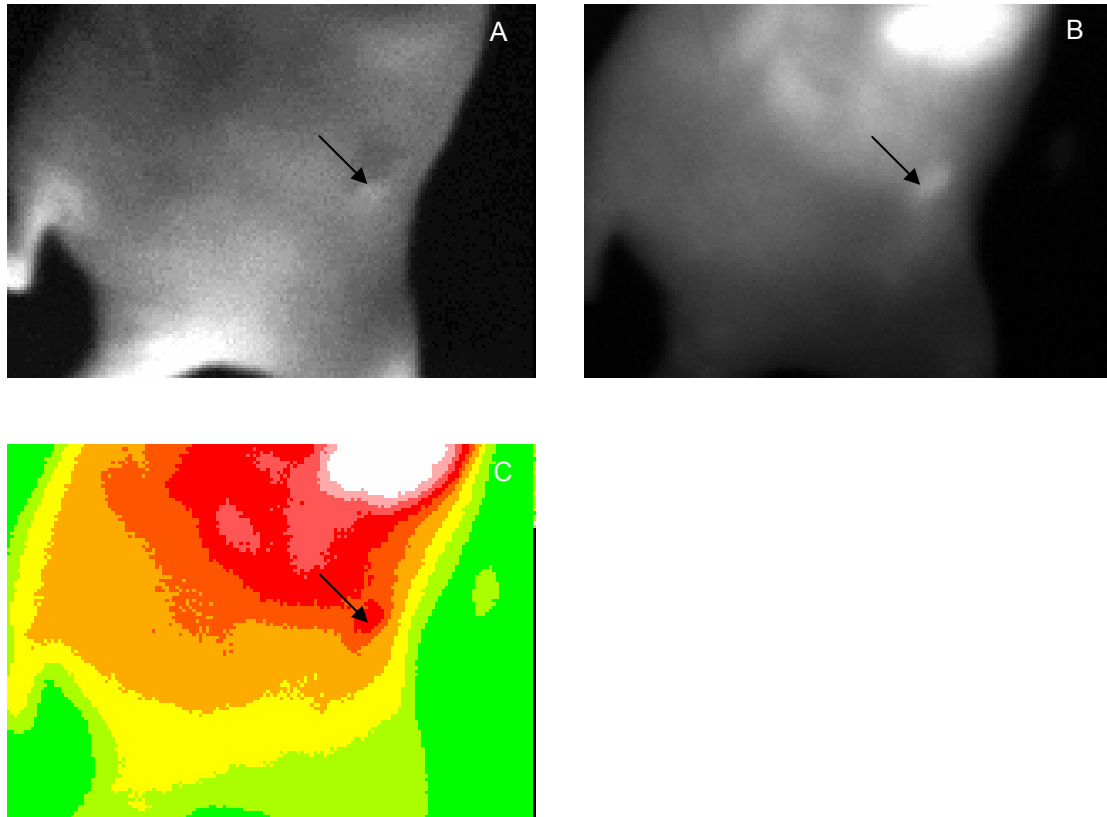


Abb. 3.58: Nacktmaus (n = 3) 24 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab), Nativbild (A), Fluoreszenzbild (B), farbkodiertes Bild (C). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.

20 h später ist das Signal des Tumors etwas stärker geworden. Die diffuse Fluoreszenz im Abdomen hat relativ gesehen abgenommen.

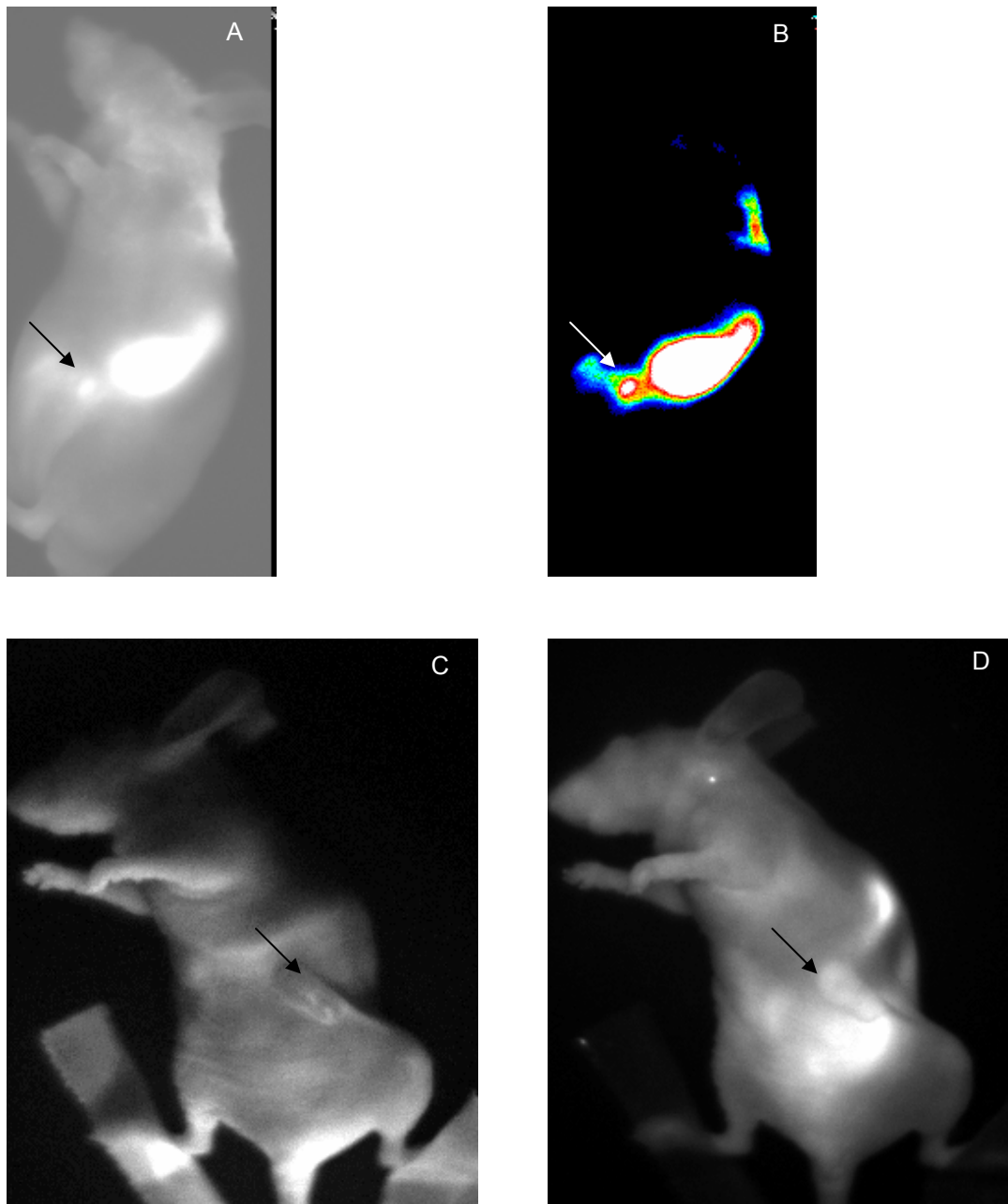


Abb. 3.59: Nacktmäuse (n = 3) 48 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab'); Fluoreszenzaufnahme (A,D), Nativbild (C), farbkodiertes Bild (B). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert. Die Tumore sind mit Pfeilen markiert.

48 h nach Injektion des Liganden hat die diffuse Fluoreszenz weiter abgenommen. Das Signal konzentriert sich jetzt auf den Tumor und die Milz. Dies wird besonders in dem farbkodierten Bild deutlich.

3. Ergebnisse

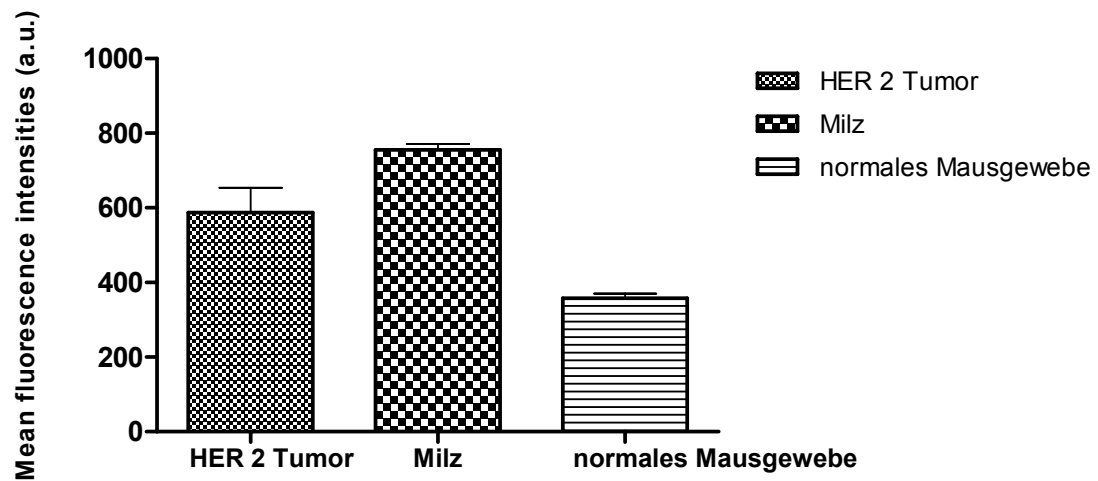


Abb. 3.60: Mittlere Fluoreszenzintensitäten 48 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab')-Fragment. Deutliches Fluoreszenzsignal in Milz und Tumor.

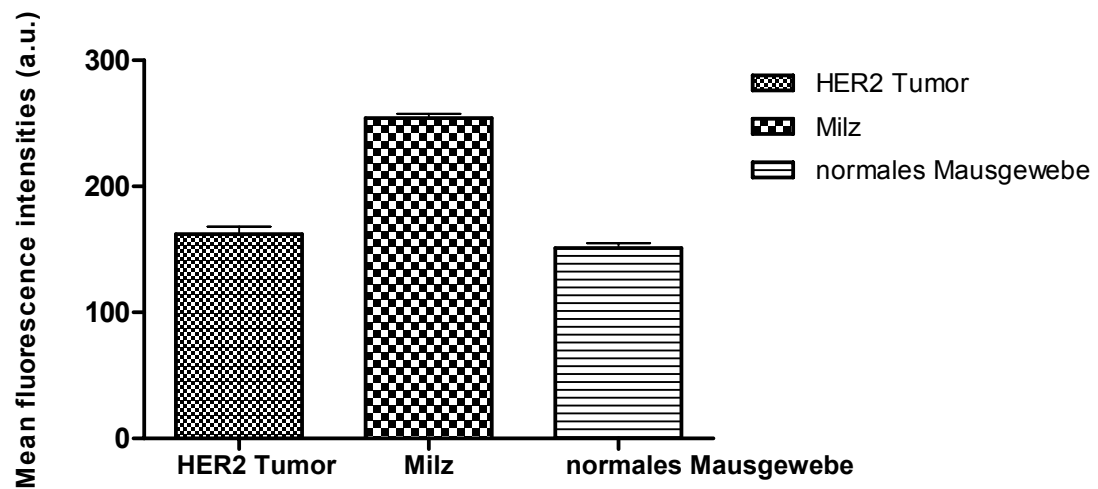


Abb. 3.61: Mittlere Fluoreszenzintensitäten 72 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab')-Fragment. Deutliches Fluoreszenzsignal in Milz und Tumor. Schlechtes Signalrauschverhältnis.

3. Ergebnisse

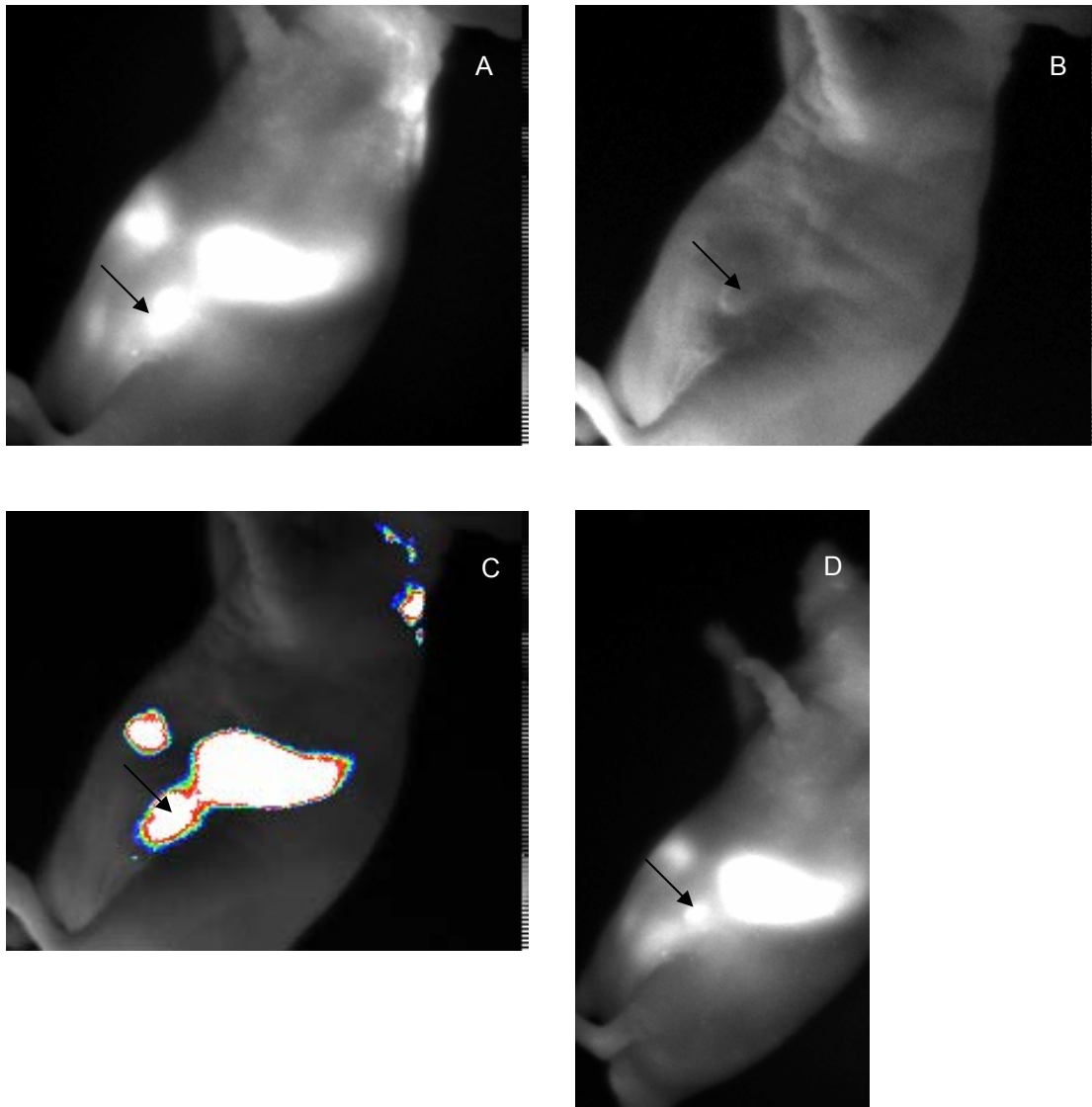


Abb. 3.62: 72 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab') (n = 3); Fluoreszenzaufnahme (A, D), Nativbild (B), farbkodiertes Bild (C). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.

Noch immer findet sich eine starke Fluoreszenz in Tumor und in der Milz.
Jedoch ungünstigeres Signalrauschverhältnis im Vergleich zu den zeitlich früher generierten Bildern.

3. Ergebnisse

Zusammenfassend sind in der nachfolgenden Tabelle die zeitabhängigen Tumorfluoreszenzintensitäten als Quotienten der mittleren Intensitäten der ErbB/Her2 positiven Tumoren und normalen Mausreferenzgeweben gezeigt.

Probe	Zeit nach intravenöser Probenapplikation				
	1 h	4 h	24 h	48 h	72 h
Cy5.5-Herceptin	n.d.	1,3 ± 0,2	2,0 ± 0,3	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,2
Cy5.5-F(ab') ₂	2,3 ± 0,3	1,6 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
Cy5.5-F(ab')	n.d.	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,0	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,0

Tabelle 3.2: Zeitabhängige Tumorfluoreszenzintensität (Lichtemission bei $\lambda = 694$ nm, als Quotient zwischen der mittleren Intensität des Tumors und normalem Mausgewebe)

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob sich das Peptid D-Glu¹Minigastrin und der Antikörper Herceptin[®], sowie dessen F(ab')₂- und F(ab')- Fragmente für die *in vivo* Darstellung CCK2- bzw. ErbB/Her2-Rezeptor exprimierender Tumoren mittels *near infrared fluorescence reflectance imaging* (FRI) eignen.

Fluoreszenzbildgebung *in vivo* ist aufgrund ihrer hohen Sensitivität und den potentiellen Anwendungsmöglichkeiten wie beispielsweise der Fluoreszenzendoskopie in der klinischen Onkologie (Haringsma et al., 1998) von wachsendem Interesse. Besonders Fluoreszenzfarbstoffe mit Absorption im nahinfraroten Bereich wie die CyDyes sind hierfür interessant, da deren Energie nur sehr gering durch Wasser und Hämoglobin absorbiert und so eine gute Gewebedurchdringung erreicht wird.

Die optische Bildgebung des Somatostatinrezeptors mit CyDye-markierten Somatostatinanaloga konnte bereits erfolgreich durchgeführt werden (Becker et al., 2001). Auch im speziellen Fall des CCK2-Rezeptors sind viele interessante Anwendungen in der Diagnostik vorstellbar sind, zumal ¹¹¹In-DTPA-D-Glu¹-Minigastrin-Szintigraphie bereits erfolgreich mit der höchsten Sensitivität im Vergleich zu PET, CT und SRS metastasierte medulläre Schilddrüsenkarzinome aufzeigen konnte (Gotthardt, Battmann et al., 2003).

Wie im Ergebnisteil beschrieben, konnte Cy5.5-Minigastrin erfolgreich synthetisiert werden; leider konnte nicht gezeigt werden, dass Cy5.5-Minigastrin spezifisch und mit ausreichend hoher Affinität an den CCK2-Rezeptor bindet. Ein Grund hierfür könnte eine unzureichende Stabilität der Substanz über eine längere Zeit im wässrigen Medium sein, oder aber der Fluoreszenzfarbstoff Cy5.5-NHS bindet an einer für die Rezeptorbindung ungünstigen Position am Peptid, so dass die Affinität zum Rezeptor erheblich herabgesetzt wird. Da auch

die Tierversuche keine eindeutigen oder viel versprechenden Ergebnisse brachten, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Im Folgenden werden deshalb nur die Experimente mit Herceptin® und seinen Fragmenten diskutiert.

Neben der Peptidbildung ist das Rezeptortargeting mit größeren Molekülen wie Antikörpern ebenfalls möglich. Die Darstellung des EGF-Rezeptors konnte mit dem Cy5.5-NHS markierten Wachstumsfaktor EGF erfolgreich durchgeführt werden (Ke et al., 2003). Bereits 1978 wurden radioaktiv-markierte Antikörper zur szintigraphischen Darstellung gastrointestinaler Tumore verwendet (Goldenberg et al., 1978). Antikörper besitzen jedoch aufgrund ihres hohen Molekulargewichts von etwa 150 kD nur eine langsame Diffusionskapazität. Der hohe interstitielle Druck und eine reduzierte vaskuläre Permeabilität verhindern eine größere Anreicherung des Antikörpers im Tumorgewebe.

Daraufhin wurden Versuche mit Antikörperfragmenten ($F(ab')_2$, $F(ab')$, scFv) durchgeführt, die einen entscheidenden Vorteil gegenüber den hochmolekularen Immunglobulinen aufwiesen. Durch eine schnellere Blutclearance konnte ein besseres Signalrauschverhältnis erreicht werden. Generell führen Eiweißverbindungen mit einem niedrigen Molekulargewicht zu einem besseren Signalrauschverhältnis (Behr, et al., 1998; Gotthardt, Boermann, 2004). Aus diesem Grund sind Peptide und niedermolekulare Proteine sehr gut für die Bildung geeignet.

Die Fluoreszenzmarkierung und die anschließende Aufreinigung von Trastuzumab und dessen $F(ab')_2$ und $F(ab')$ -Fragmenten konnte reproduzierbar durchgeführt werden.

Der nächste Schritt war es, die Bindungsaffinitäten der fluoreszenzmarkierten Rezeptorliganden zu bestimmen. Dazu wurden IC_{50} -Werte ermittelt. Diese Werte entsprechen den Verdrängungskonzentrationen, bei denen die spezifische Bindung des bei dem Versuch eingesetzten Radioliganden 50 %

beträgt und somit indirekt den relativen Affinitäten der nicht radioaktiv markierten Liganden zum ErbB/Her2 Rezeptor entsprechen. Die unterschiedlichen IC_{50} -Werte können hier aufgrund derselben Versuchsanordnung miteinander in Beziehung gesetzt werden. Zunächst wurde der IC_{50} -Wert von unmarkiertem Trastuzumab (Herceptin® der Firma Roche) ermittelt.

Der Wert von Cy5.5-markiertem Herceptin® lässt auf eine etwas geringere Affinität im Vergleich unmarkiertem Herceptin zum ErbB/Her2-Rezeptor schließen. Dies ist vor allem durch ein durch den Fluoreszenzfarbstoff hervorgerufenen ungünstigeres Verhältnis der Antikörperbindungsstellen zur Bindungsstelle des Rezeptors erklärbar. Dies kommt durch Kopplung von Cy5.5 an Amine des Herceptins, die zur Antigenbindungsstelle gehören, zu Stande. Der Affinitätswert von fluoreszenzmarkiertem $F(ab')_2$ -Fragment ist etwa vergleichbar mit dem Wert von unmarkiertem Herceptin®; diese hier wiederum im Vergleich zu Cy5.5-Herceptin® gesteigerte Rezeptoraffinität lässt sich dadurch erklären, dass das $F(ab')_2$ -Fragment praktisch nur aus den beiden rezeptorbindenden Anteilen des Antikörpers besteht. Das *Fitting* ist hier günstiger als beim kompletten Antikörper.

Das Cy5.5-markierte $F(ab')$ -Fragment hat verglichen mit dem $F(ab')_2$ -Fragment eine niedrigere relative Affinität zum ErbB/Her2-Rezeptor, dies ist leicht erklärbar, wenn man bedenkt, dass dieses statt zwei nur eine Rezeptorbindungsstelle besitzt. Seine Affinität ist nur unwesentlich geringer als die des Cy5.5-Herceptins®.

Nachdem in den *in vitro* Versuchen gezeigt werden konnte, dass die hergestellten Liganden mit einer guten Affinität an den entsprechenden Rezeptor binden, wurden Fluoreszenzmikroskopieversuche mit SKOV3- Zellen und den Cy5.5-markierten Liganden durchgeführt. Hier sollte gezeigt werden, dass eine Bindung an den ErbB/Her2 Rezeptor an lebenden Zellen erfolgt und geklärt werden, ob eine Rezeptorinternalisierung stattfindet. Mit dem verwendeten konfokalen Mikroskop war es möglich, Schnittebenen $< 0.8 \mu m$ zu wählen. Bei diesen Schichtdicken ist es möglich, die Ebene so zu wählen, dass

zwischen Fluoreszenzsignalen innerhalb der Zelle und solchen an der Zelloberfläche unterschieden werden kann.

Bei allen drei getesteten ErbB/Her2-Rezeptorliganden konnte bereits eine halbe Stunde nach Applikation des Liganden eine Anlagerung an die Zellmembranen der SKOV3 Zellen beobachtet werden. Die detektierte Fluoreszenz an der Zellmembran steigerte sich mit der Zeit und nach 9 h im Fall der Antikörperfragmente bzw. nach 24 h im Fall des kompletten Antikörpers ließen sich deutliche Fluoreszenzsignale im Inneren der Zellen nachweisen. Es kann hier von einer Aufnahme der Rezeptorliganden in die Zellen ausgegangen werden. Als wahrscheinlichster Mechanismus kommt eine Internalisierung des Rezeptorkomplexes in das Zytoplasma der Zelle in Frage. *Wartlick* und Mitarbeiter machten bei fluoreszenzmarkierten, an Herceptin® gekoppelten Nanocolloiden ähnliche Beobachtungen (*Wartlick et al.*, 2004). Die Zellkerne der beobachteten Zellen blieben bei unseren Versuchen und auch bei den Versuchen der Gruppe um *Wartlick* stets ausgespart. So kann vermutet werden, dass die Cy5.5-markierten Liganden die Kernmembran nicht passieren. In einer Arbeit von *Hilger* konnte die Aufnahme von Cy5.5-Herceptin® in die ErbB/Her2 überexprimierenden SKBR3 Zellen mittels FACS-Analyse bestätigt werden (*Hilger et al.*, 2004). Auch dies bestätigt unsere Beobachtung, dass der Ligandrezeptorkomplex in die Zelle aufgenommen wird.

Nachdem *in vitro* in der Zellkultur gezeigt werden konnte, dass die CyDye markierten Antikörper und deren Fragmente mit ausreichender Affinität an die ErbB/Her2-Rezeptoren binden und anschließend in die Zellen aufgenommen werden, wurde die *in vivo* Rezeptorbildgebung mittels *NIR-fluorescence reflectance imaging* an lebenden athymischen Mäusen, die ErbB/Her2-rezeptorpositive Tumore trugen, erprobt. Wie im Ergebnisteil ersichtlich, ließen sich die ErbB/Her2-positiven Tumoren mit Hilfe der Rezeptorliganden Cy5.5-Herceptin® und Cy5.5-F(ab') darstellen, im Falle des Cy5.5-F(ab')₂-Fragments hob sich der Tumor nur in den ersten 4 h Stunden leicht vom übrigen Gewebe ab. Die besten Ergebnisse wurden im Fall des Cy5.5-Herceptins® 24-48 h nach Applikation des Antikörpers erzielt. 48 h nach Applikation waren die

Fluoreszenzsignale der Leber und Milz deutlich schwächer und der Tumor dadurch deutlicher abzugrenzen. Die Anreicherung in Leber und Milz lässt sich durch eine Anreicherung des Antikörpers und seiner Abbauprodukte im retikuloendothelialen System (RES) dieser Organe erklären.

Mit Cy5.5-F(ab') als Ligand stellte sich der Tumor bereits 4 h nach Applikation des Antikörperfragments dar. Der ErbB/Her2-positive Tumor war auch 72 h nach Applikation weiter gut bildgebend, die Signalrauschverhältnisse besserten sich während dieser Zeit. Der Grund hierfür könnte sein, dass die unspezifisch gebundenen Antikörperfragmente inzwischen ausgeschieden wurden, bzw. sich in den abbauenden Organen konzentriert haben.

Die ErbB/Her2-positiven Tumore waren unter Verwendung des Cy5.5-F(ab')₂-Fragments von Herceptin® nur sehr eingeschränkt bildgebend. Dieses Ergebnis lässt sich am ehesten erklären, wenn man sich mit der Kinetik dieser Liganden beschäftigt. Antikörper besitzen aufgrund ihres hohen Molekulargewichts von etwa 150 kD nur eine langsame Diffusionskapazität, ein hoher interstitielle Druck und eine durch die hohe Molekülgröße reduzierte vaskuläre Permeabilität verhindern eine größere Anreicherung des Antikörpers im Tumorgewebe. Jedoch ist die Größe des Antikörpers mit einer langsamen Blutclearance verbunden, der Antikörper zirkuliert lange im Blut bis er den Tumor erreicht. Es stehen zwei Rezeptorbindungsstellen zur Verfügung, was zu einer guten Rezeptoraffinität führt. Die langsame Blutclearance führt jedoch zu einem hohen Signalrauschverhältnis, der Tumor kommt dadurch erst relativ spät zur Darstellung. Die Fluoreszenzanreicherung in Leber und Milz ist durch den langsamen Abbau des großen Proteins relativ hoch.

Die Größe des F(ab')-Fragments ist mit 40 kD deutlich günstiger für die Bildgebung. Es hat den Vorteil einer deutlich besseren Diffusionskapazität ins Gewebe und einer größeren vaskulären Permeabilität. Die Clearance ist bei einem 40 kD großen Molekül im Vergleich zu einem 150 kD großen Antikörper deutlich gesteigert, das alles führt zu guten Signalrauschverhältnissen.

Das F(ab')₂-Fragment liegt mit seiner Größe von etwa 100 kD zwischen Antikörper und dem F(ab')-Fragment, dies führt zu dem Problem, dass die Diffusionskapazität ins Gewebe kleiner der des F(ab')-Fragments ist; die Clearance ist verglichen mit dem Antikörper aber deutlich gesteigert. So kommt es zunächst zu ungünstigen Signalrauschverhältnissen, kombiniert mit einer zügigen Blutclearance. Dies führt unserer Theorie nach dazu, dass der Tumor nur sehr schlecht zur Darstellung kommt (Behr, et al., 1998; Gotthardt, Boermann, 2004).

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl der Antikörper Cy5.5-Herceptin®, als auch das Cy5.5-markierte F(ab')-Fragment für die *in vivo* Nahinfrarot-Fluoreszenzbildgebung geeignet sind. Das Cy5.5-F(ab')₂-Fragment hat sich trotz viel versprechender Ergebnisse *in vitro* für die *in vivo* Bildgebung eher als ungeeignet erwiesen. Somit ist es uns gelungen, die 2004 veröffentlichten Ergebnisse von Hilger et al. in Bezug auf die Fluoreszenzbildgebung mit Cy5.5-Trastuzumab an SKBR3-Zellen zu bestätigen (Hilger et al., 2004). Wir konnten die Ergebnisse auf SKOV3-Zellen erweitern, und darüber hinaus zeigen, dass das F(ab')-Fragment des Antikörpers sich ebenfalls für die Bildgebung eignet und bereits deutlich früher und mit besseren Signalrauschverhältnissen in der Bildgebung sichtbar wird.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse sind verschiedene klinische Anwendungen der molekularen Darstellung des ErbB/Her2- Rezeptors vorstellbar. So wäre eine Anwendung in der nicht invasiven Diagnostik des ErbB/Her2-positiven Mammakarzinoms denkbar. Jedoch ist die molekulare Bildgebung für einen Einsatz in der *präventiven* Brustkrebsdiagnostik eher nicht geeignet, da die Inzidenz der ErbB/Her2-positiven Brusttumore mit 20-25 % aller Mammakarzinome eher gering ist.

Da die Eindringtiefe des NIR-Lichts, die theoretisch bei mehreren Zentimetern liegen sollte, durch signifikante Streuung des sichtbaren und infraroten Bereichs des Lichts im Gewebe auf fünf bis acht Millimeter begrenzt ist, lässt das FRI keine quantitative Bestimmung der Fluoreszenzkonzentration und Größe des

fluoreszierenden Bereichs zu (Ntziachristos, Ripoll, Weissleder, 2002). Aus diesem Grund müsste in der Bildgebung des Mammakarzinoms die Rezeptorbildgebung mit der molekularen Fluoreszenztomographie (*fluorescence mediated molecular tomography* (FMT) kombiniert werden (Ntziachristos, Bremer, Graves et al., 2002). So wird eine volumetrische Messung möglich, bei der die Eindringtiefe ins Gewebe und die Bildauflösung gesteigert ist. Das Signalrauschverhältnis wird durch mehrere Aufnahmen aus verschiedenen Projektionswinkeln reduziert. So besteht auch die Möglichkeit der Quantifizierung der Fluoreszenzstärke.

Auf diesem Weg könnte bereits präoperativ der Rezeptorstatus eines Mammatumors festgestellt werden und so beispielsweise die Indikation zu einer Therapie mit Herceptin® gestellt werden, wenn Herceptin® in der Zukunft für die adjuvante und/oder neoadjuvante Therapie des ErbB/Her2-positiven Mammakarzinoms zugelassen werden sollte (Hennessy, 2005; Smith, 2007).

Die Anwendung der molekularen Fluoreszenzbildgebung in der Verlaufsbeobachtung der Therapie des ErbB/Her2-positiven Mamma-karzinoms ist ebenfalls vorstellbar. Kurzfristige Verlaufkontrollen sind hier aufgrund der fehlenden Strahlenbelastung möglich. Unter Einsatz der molekularen Fluoreszenztomographie kann so eine Veränderung des Rezeptorstatus detektiert werden, und der sinnvolle Einsatz von Trastuzumab laufend überprüft und frühzeitig ein Ansprechen oder auch ein Progress der Erkrankung erkannt werden.

Eine weitere denkbare Anwendungsmöglichkeit der Fluoreszenzbildgebung mit Herceptin® und Herceptin®-Fragmenten ist die intraoperative oder laparoskopische Darstellung peritonealer Metastasen von ErbB/Her2neu-positiven Ovarialkarzinomen und Mammakarzinomen. Der postoperativ verbliebene Tumorrest ist für Patientinnen mit fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen der entscheidende Prognosefaktor (Aletti et al., 2006). Ziel des operativen Vorgehens ist daher die komplette Tumoresektion. Mit Hilfe der Fluoreszenzdarstellung könnten intraoperativ kleinste Tumorreste oder eine

makroskopisch unsichtbare Tumoraussaat sichtbar gemacht werden. Intraoperative und endoskopische Imaging Systeme existieren bereits (Nakayama et al., 2002; Funovics et al., 2003). Auch der intraoperative Einsatz zur Wächterlymphknotendetektion (*sentinel node detection*) ist durchaus denkbar.

Da Herceptin® bereits erfolgreich in der Therapie des Mammakarzinoms eingesetzt wird, sollte die Verträglichkeit des Cy5.5-markierten Antikörpers und seiner F(ab')-Fragmente gewährleistet sein, dies müsste jedoch in weiteren Studien bewiesen werden.

5. Zusammenfassung

Die große Herausforderung der molekularen Bildgebung liegt darin, biochemische Vorgänge auf Zellebene sichtbar zu machen. Eine interessante Methode hierfür ist die *in vivo* Fluoreszenzbildgebung im Nahinfrarotbereich. Aufgrund des günstigen Absorptionsspektrums von Hämoglobin und Wasser im nahinfraroten Bereich kann die Strahlung von Fluoreszenzfarbstoffen, die im nahinfraroten Bereich des Spektrums absorbieren, besonders gut Gewebe durchdringen.

In dieser Arbeit wurde mit geeigneten Liganden und dieser Methode versucht, CCK2-, sowie ErbB/Her2-rezeptorpositive Tumore im Tiermodell darzustellen. Als Ligand des CCK2-Rezeptors diente D-Glu¹-Minigastrin, ein Peptid, das bereits zur szintigraphischen Bildgebung des CCK2-Rezeptors eingesetzt wird. D-Glu¹-Minigastrin konnte erfolgreich an den Fluoreszenzfarbstoff Cy5.5-NHS gebunden werden. In *in vitro* Bindungsstudien konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass dieses Substrat mit ausreichender Affinität und Selektivität an den CCK2-Rezeptor bindet. Vielleicht ist dies erklärbar durch eine unzureichende Stabilität der Substanz in wässrigen Medien, oder aber durch eine Beeinflussung der Rezeptorbindungsstellen des Peptids durch den lipophilen Fluoreszenzfarbstoff, so dass die Affinität der Substanz zum Rezeptor gestört wird. Auch in *in vivo* Versuchen kamen die Rezeptoren nicht zur Darstellung, so dass dieser Teil der Arbeit nicht weiter verfolgt wurde.

Zur Darstellung des ErbB/Her2-Rezeptors wurden Herceptin[®], ein Antikörper der in der Therapie des metastasierten ErbB/Her2-positiven Mammakarzinoms eingesetzt wird, und dessen F(ab')₂- und F(ab')-Fragmente als Liganden ausgewählt. Bei den Fragmenten sollte durch ihr niedrigeres Molekulargewicht eine schnellere Blutclearance und dadurch ein besseres Signalrauschverhältnis erreicht werden. Die Liganden konnten erfolgreich hergestellt, an Cy5.5-NHS gebunden und aufgereinigt werden. In Bindungsstudien konnten IC₅₀-Werte

ermittelt werden, die zeigen, dass Herceptin® und seine Fragmente *in vitro* mit guter Affinität an den ErbB/Her2-Rezeptor binden. Daraufhin wurden konfokale Mikroskopieversuche mit ErbB/Her2-positiven SKOV3-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden für bis zu 24 h mit jeweils einem von den drei Liganden inkubiert. Im Fall der Antikörperfragmente ließen sich nach 9 h, bei dem kompletten Antikörper nach 24 h deutliche Fluoreszenzsignale im Inneren der Zellen nachweisen, so dass von einer Internalisierung des Rezeptorkomplexes in das Zytoplasma der Zelle ausgegangen werden kann.

Nachdem *in vitro* in der Zellkultur gezeigt werden konnte, dass die CyDye-markierten Antikörper und deren Fragmente mit ausreichender Affinität an die ErbB/Her2-Rezeptoren binden, wurde mittels *NIR-fluorescence reflectance imaging* die *in vivo* Bildgebung an Mäusen mit ErbB/Her2-positiven Tumoren erprobt. Die ErbB/Her2-positiven Tumoren ließen sich mit den Rezeptorliganden Cy5.5-Herceptin® und Cy5.5-F(ab') erfolgreich darstellen, im Falle des Cy5.5-F(ab')₂-Fragments hob sich der Tumor nur sehr schlecht vom übrigen Gewebe ab. Eine Begründung ist am ehesten in der Pharmakokinetik und dem Verhältnis zwischen Gewebediffusion und Blutclearance der Antikörperfragmente zu finden.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse sind verschiedene klinische Anwendungen der molekularen Darstellung des ErbB/Her2-Rezeptors vorstellbar. Eine Anwendung in der nichtinvasiven Diagnostik des Her2neu positiven Mammakarzinoms ist denkbar. So könnte nichtinvasiv der Rezeptorstatus eines Mammatumors festgestellt werden und beispielsweise die Indikation zu einer neoadjuvanten Therapie mit Herceptin® gestellt werden, sollte sich in Zukunft ein neoadjuvanter Einsatz von Herceptin® als therapeutisch sinnvoll erweisen. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Fluoreszenzbildgebung mit Herceptin® und Herceptin®-Fragmenten ist die intraoperative oder laparoskopische Darstellung abdomineller Metastasen von ErbB/Her2neu-positiven Ovarial-, Zervix-, Colon-, und Mammakarzinomen. Intraoperative und endoskopische Fluoreszenzbildgebungssysteme existieren bereits.

6. Summary

The great aim of molecular imaging is to visualize biochemical processes at the cellular level. An interesting method for this purpose is in vivo near-infrared fluorescence imaging. However, the strong UV-VIS-absorption of blood and tissue due to hemoglobin and its derivatives makes it necessary to move to fluorescent dyes which absorb in near-IR and therefore reach much higher fluorescence emission intensities in tissue.

Exploiting this methodology, near-IR fluorescent dyes were coupled to peptide ligands for CCK2 and ErbB/Her2 to image tumors expressing these receptors in an animal model. As ligand for the CCK2 receptor, we chose D-Glu¹-minigastrin, a peptide which had already been employed for the scintigraphic imaging of this receptor. D-Glu¹-minigastrin could be coupled with the activated dye Cy5.5-NHS, but in vitro binding studies showed that the construct does not represent a high-affinity ligand to the CCK2 receptor. A possible rationale for this is that the receptor binding of the peptide is negatively affected by the covalently bound hydrophobic dye. In vivo studies supported the data collected in the binding assays.

Herceptin, an antibody used in the therapy of metastasizing Her2-positive breast cancer, was chosen as a suitable ligand for imaging the ErbB/Her2 receptor. In addition, the F(ab')₂ - and F(ab')-fragments of herceptin were studied as possible ligands. We expected them to show a more favorable signal to noise ratio due to their lower molecular weight and therefore faster blood clearance. The ligands could be successfully prepared, coupled to Cy5.5-NHS. The IC₅₀ values obtained from binding assays with herceptin and its antibody fragments indicate a high-affinity interaction with the ErbB/Her2 receptor. Encouraged by these results, we turned to microscopic investigations with ErbB/Her2-positive SKOV3 cells. For this purpose, the cells were incubated for up to 24 h with either herceptin, its F(ab')₂ - or its F(ab') fragment. After 9 h in

case of the antibody fragments and 24 h in case of herceptin, distinct fluorescence signals could be observed inside the cells, indicating efficient cellular internalization of the receptor-ligand complex.

After having shown in vitro as well as in cell culture assays that the Cy5.5-labeled antibodies and their fragments efficiently bind to ErbB/Her2 receptors, we tried in vivo imaging of mice carrying Her2-positive tumors by NIR-fluorescence reflectance techniques. The ErbB2-positive tumors could be successfully imaged with our dye-labeled ligands Cy5.5-herceptin and Cy5.5-F(ab'). In case of the Cy5.5-F(ab')₂ fragment however, only poor contrast between tumor and surrounding tissue could be obtained, possibly due to less favorable pharmacokinetic properties of the F(ab')₂ fragment.

Possible clinical applications of these results may arise in the non-invasive diagnostics of ErbB/Her2neu-positive breast tumors. Once the receptor-status of a diagnosed tumor is established using the previously discussed imaging techniques, a rational therapy using herceptin can be envisaged. Further applications of fluorescence imaging with herceptin derivatives are the intraoperative or laparoscopic identification of abdominal metastases of ErbB/Her2neu-positive ovarian, cervical, colon or breast tumors, using existing endoscopic fluorescence imaging apparatus.

7. Literaturverzeichnis

Amersham pharmacia biotech: Fluorescence = An Overview:
www4.amershambiosciences.com,
[http://www4.amershambiosciences.com/applic/upp00738.nsf/vLookupDoc/218024415-B500/\\$file/63002879.pdf](http://www4.amershambiosciences.com/applic/upp00738.nsf/vLookupDoc/218024415-B500/$file/63002879.pdf)

Aletti GD, Dowdy SC, Gostout BS, Jones MB, Stanhope CR, Wilson TO, Podratz KC, Cliby WA, 2006: Aggressive surgical effort and improved survival in advanced-stage ovarian cancer.
Obstet Gynecol., 107(1):77-85

Alimandi M, Romano A, Curia MC, Muraro R, Fedi P, Aaronson SA, Di Fiore PP, Kraus MH, 1995: Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas.
Oncogene, 10(9):1813-21

Barbacci EG, Pustilnik LR, Rossi AMK, Emerson E, Miller PE, Boscoe BP, Cox ED, Iwata KK, Jani JP, Provoncha K, Kath JC, Liu Z, Moyer JD, 2003: The Biological and Biochemical Effects of CP-654577, a Selective erbB2 Kinase Inhibitor, on Human Breast Cancer Cells.
Cancer Res., 63(15):4450-9

Becker A, Hassenius C, Licha K, Ebert B, Sukowski U, Semmler W, Wiedenmann B, Grotzinger C, 2001: Receptor-targeted optical imaging of tumors with near-infrared fluorescent ligands.
Nat Biotechnol., 19(4):327-31

Behe M, Behr TM, 2002: Cholecystokinin-B (CCK-B)/gastrin receptor targeting peptides for staging and therapy of medullary thyroid cancer and other CCK-B receptor expressing malignancies.
Biopolymers, 66(6):399-418

Behr TM, Goldenberg DM, Becker W, 1998: Reducing the renal uptake of radiolabeled antibody fragments and peptides for diagnosis and therapy: present status, future prospects and limitations.

Eur J Nucl Med., 25(2):201-212

Behr TM, Gotthardt M, Barth A, Behe M, 2001: Imaging tumors with peptide-based radioligands.

Q J Nucl Med., 45(2):189-200

Behr TM, Jenner N, Behe M, Angerstein C, Gratz S, Raue F, Becker W, 1999: Radiolabeled peptides for targeting cholecystokinin-B/gastrin receptor-expressing tumors.

J Nucl Med., 40(6):1029-44

Blume-Jensen P, Hunter T, 2001: Oncogenic kinase signalling.

Nature, 411(6835):355-65

Bremer C, Bredow S, Mahmood U, Weissleder R, Tung CH, 2001: Optical imaging of matrix metalloproteinase-2 activity in tumors: feasibility study in a mouse model.

Radiology, 221(2):523-9

Colomer R, Montero S, Lluch A, Ojeda B, Barnadas A, Casado A, Massuti B, Cortes-Funes H, Lloveras B, 2000: Circulating HER2 extracellular domain and resistance to chemotherapy in advanced breast cancer.

Clin Cancer Res., 6(6):2356-62

Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA, 1987: erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells.

Science, 237(4811):178-82

Fornier M, Risio M, Van Poznak C, Seidman A, 2002: HER2 testing and correlation with efficacy of trastuzumab therapy.

Oncology (Huntingt), 16(10):1340-8, 1351-2

Funovics MA, Alencar H, Su HS, Khazaie K, Weissleder R, Mahmood U, 2003: Miniaturized multichannel near infrared endoscope for mouse imaging. *Mol Imaging*, 2(4):350-7

Gotthardt M, Battmann A, Beuter D, Bauhofer A, Schipper ML, Béhé MP, 2003: Comparison of ^{111}In -D-Glu¹-Minigastrin, ^{18}F -FDG PET, and CT scanning for the detection of metastatic medullary thyroid carcinoma. *J Nucl Med*, 44 (5): 169P

Gotthardt M, Grass J, Behe MP, Schipper ML, Schlieck A, Wied MU et al, 2003: ^{111}In -D-Glu¹-Minigastrin in the diagnosis of neuroendocrine tumors: a comparison to ^{111}In -pentetreotide. *J Nucl Med*, 44 (5): 74P

Gotthardt M, Boermann OC, Behr TM, Behe MP, Oyen WJ, 2004: Development and clinical application of peptide-based radiopharmaceuticals. *Curr Pharm Des.*, 10(24):2951-63

Hakanson R, Axelson J, Ihse I, Sundler F, 1991: Trophic effects of gastrin and cholecystokinin. *Z Gastroenterol Verh.*, 26:265-9

Haringsma J, Tygat GN, 1998: The value of fluorescence techniques in gastrointestinal endoscopy: better than the endoscopist's eye? *Endoscopy*, 30(4):416-8

Harris JC, Clarke PA, Awan A, Jankowski J, Watson SA, 2004: An antiapoptotic role for gastrin and the gastrin/CCK-2 receptor in Barrett's esophagus. *Cancer Res.*, 64(6):1915-9

Heim R, Cubitt AB, Tsien RY, 1995: Improved green fluorescence. *Nature*, 373:663-664

Hellström I, Goodman G, Pullman J, Yang Y, Hellstrom KE, 2001: Overexpression of HER-2 in ovarian carcinomas. *Cancer Res.*, 61(6):2420-3

Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, 2005: Individualization of neoadjuvant therapy for breast cancer according to molecular tumor characteristics. Nat Clin Pract Oncol., 2(12):598-9

Hilger I, Leistner Y, Berndt A, Fritsche C, Haas KM, Kosmehl H, Kaiser WA, 2004: Near-infrared fluorescence imaging of HER-2 protein over-expression in tumour cells. Eur Radiol., 14(6):1124-9

Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK, 2002: Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. Nature, 416(6878):279-80

Johnson LR, 1976: The trophic action of gastrointestinal hormones. Gastroenterology, 70(2): 278-288

Ke S, Wen X, Gurfinkel M, Charnsangavej C, Wallace S, Sevic-Muraca EM, Li C, 2003: Near-infrared optical imaging of epidermal growth factor receptor in breast cancer xenografts. Cancer Res., 63(22):7870-5

Konig K, 2000: Multiphoton microscopy in life sciences. J Microsc, 200 (Pt 2):83-104

Korlach J, Schuille P, Webb WW, Feigenson GW, 1999: Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. Proc Natl Acad Sci, 96(15):8461-6

Lara PN Jr, Meyers FJ, Gray CR, Edwards RG, Gumerlock PH, Kauderer C, Tichauer G, Twardowski P, Doroshow JH, Gandara DR, 2002: HER-2/neu is overexpressed infrequently in patients with prostate carcinoma. Cancer, 94(10):2584-9

Massoud TF, Gambhir SS, 2003: Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. Genes & Development, 17: 545-580

Matsumori Y, Katakami N, Ito M, Taniguchi T, Iwata N, Takaishi T, Chihara K, Matsui T, 1995: Cholecystokinin-B/gastrin receptor: a novel molecular probe for human small cell lung cancer.

Cancer Res., 55(2):276-9

Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J, 2001: Trastuzumab (Herceptin), a Humanized Anti-HER2 Monoclonal Antibody, Inhibits Basal and Activated HER2 Ectodomain Cleavage in Breast Cancer

Cells.Cancer Res., 61:4744-4749

Mujumdar RB, Ernst LA, Mujumdar SR, Lewis CJ, Waggoner AS, 1993:

Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters.

Bioconjug Chem., 4(2):105-11

Nahta R, Esteva FJ, 2003: HER-2-targeted therapy: lessons learned and future directions.

Clin Cancer Res., 9(14):5078-84

Nakayama A, del Monte F, Hajjar RJ, Frangioni JV, 2002: Functional near-infrared fluorescence imaging for cardiac surgery and targeted gene therapy.

Mol Imaging, 1(4):365-77

Niehans GA, Singleton TP, Dykoski D, Kiang DT, 1993: Stability of HER-2/neu expression over time and at multiple metastatic sites.

J Natl Cancer Inst., 85(15):1230-5

Ntziachristos V, Bremer C, Graves EE, Ripoll J, Weissleder R, 2002: In vivo tomographic imaging of near-infrared fluorescent probes.

Mol Imaging, 1(2):82-88

Ntziachristos V, Bremer C, Weissleder R, 2003: Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging.

Eur Radiol., 13(1):195-208

Ntziachristos V, Ripoll J, Weissleder R, 2002: Would near-infrared fluorescence signals propagate through large human organs for clinical studies.
Opt Lett, 27: 527-29

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M et al., 2005: Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer.
N Engl J Med, 353(16):1659-72.

Rehfeld JF, van Solinge WW, 1994: The tumor biology of gastrin and cholecystokinin.
Adv. Cancer Res., 63: 295-347

Reiser M, Kuhn FP, Debus J, 2004: Lehrbuch der Radiologie. Thieme Verlag

Reubi JC, Schaer JC, Waser B, 1997: Cholecystokinin(CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors.
Cancer Res., 57(7):1377-86

Reubi JC, Waser B, 1996: Unexpected high incidence of cholecystokinin-B/gastrin receptors in human medullary thyroid carcinomas.
Int J Cancer, 67(5):644-7

Roskoskoski, R, 2004: The ErbB/Her receptor protein kinases and cancer.
Biochemical and Biophysical Research Communications, 319: 1-11

Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N, 1995: Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies.
Crit Rev Oncol Hematol., 19(3):183-232

Sarup JC, Johnson RM, King KL, Fendly BM, Lipari MT, Napier MA, Ullrich A, Shepard HM, 1991: Characterization of an anti-p185HER2 monoclonal antibody that stimulates receptor function and inhibits tumor cell growth.
Growth Regul., 1(2):72-82.

Segatto O, King CR, Pierce JH, Di Fiore PP, Aaronson SA, 1988: Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the erbB-2 gene.

Mol Cell Biol., 8(12):5570-4

Schaer JC, Reubi JC, 1999: High gastrin and cholecystokinin (CCK) gene expression in human neuronal, renal, and myogenic stem cell tumors: comparison with CCK-A and CCK-B receptor contents.

J Clin Endocrinol Metab., 84(1):233-9

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL, 1987: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.

Science, 235(4785):177-82

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L, 2001: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.

N Engl J Med., 344(11):783-92

Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, Goldhirsch A, Untch M, Mariani G, Baselga J, Kaufmann M et al., 2007: 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial.

Lancet; 369(9555):29-36.

Tung CH, Bredow S, Mahmood U, Weissleder R, 1999: Preparation of a cathepsin D sensitive near-infrared fluorescence probe for imaging.

Bioconjug Chem., 10(5):892-6

Voet D, Voet JG, Pratt CW, 2002: Lehrbuch der Biochemie. Wiley- VCH-Verlag

Vogel CL, Franco SX, 2003: Clinical experience with trastuzumab (herceptin).

Breast J., 9(6):452-62

Wartlick H, Michaelis K, Balthasar S, Strebhardt K, Kreuter J, Langer K, 2004:
Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in
tumour cells.

J Drug Target., 12(7):461-71

Weissleder R, 2001: A clearer vision for in vivo imaging.

Nat Biotechnol., 19(4):316-7

Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA, King W, Seelig S, Arteaga CL, 2002:
Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for
antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action.

Cancer Res., 62(14):4132-41

Yamauchi H, O'Neill A, Gelman R, Carney W, Tenney DY, Hosch S, Hayes DF, 1997:
Prediction of response to antiestrogen therapy in advanced breast cancer
patients by pretreatment circulating levels of extracellular domain of the HER-2/c-neu
protein.

J Clin Oncol., 15(7):2518-25

Yarden Y, Sliwkowski MX, 2001: Untangling the ErbB signalling network.

Nat Rev Mol Cell Biol., 2(2):127-37

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Absorptionsspektren von Wasser, oxigeniertem und desoxigeniertem Hämoglobin (Weissleder, 2001).	-4-
Abb. 1.2	Der Fluoreszenz-Prozess, (aus Amersham pharmacia biotech: Fluorescence).	-5-
Abb. 1.3	Typisches <i>fluorescence reflectance imaging</i> System. Die Lichtquelle und die CCD-Kamera befinden sich auf derselben Seite des betrachteten Tiers. Alle Komponenten befinden sich üblicherweise in einer lichtundurchlässigen Box (Ntziachristos et al., 2003).	-6-
Abb. 1.4	Strukturformel des CyDyes Cy5.5-NHS-Esters, Absorptionswellenlänge 674 nm, Emissionswellenlänge 689 nm.	-8-
Abb. 1.5	Reaktionsschema der NHS-Ester-Reaktion	-10-
Abb. 1.6	Schematische Darstellung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors und Darstellung des <i>second messenger pathways</i> über Phosphatidylinositolphosphat (Voet, 2002).	-12-
Abb. 1.7	Die ErbB-Genfamilie und die Rezeptorliganden. Die inaktive Ligandenbindungsdomäne des ErbB2-Rezeptors und die inaktive Kinasedomäne des ErbB3-Rezeptors sind durch ein X gekennzeichnet. (Roskoski, 2004).	-17-
Abb. 1.8	Wege der Signaltransduktion der Erb/Her-Rezeptor-Familie (Yarden, 2001).	-18-
Abb. 1.9	Heterodimere mit ErbB/Her2 (Yarden, 2001).	-19-

Abb. 2.1	FRI-System von Hamamatsu Photonics, bestehend aus einer Wolframlichtquelle, CCD-Kamera, Kühlung und verschiedenen Filtern	-43-
Abb. 3.1	HPLC-Methode: Flussgeschwindigkeit 1 ml/min, Laufmittel A: H ₂ O + 0,1 % TFA, Laufmittel B: 70 % Acetonitril; die Retentionszeiten der einzelnen Verbindungen sind eingezeichnet.	-45-
Abb. 3.2	Kontrolle des Reaktionsablaufs zur Synthese von Cy5.5-Minigastrin, oben UV-Vis- Kanal1 (280 nm), unten UV-Vis-Kanal2 (674 nm).	-46-
Abb. 3.3	Cy5.5-Minigastrin nach der Aufreinigung, oben UV-Vis-Kanal1 (280 nm), unten UV-Vis-Kanal2 (674 nm).	-47-
Abb. 3.4	Bindungsstudie Cy5.5-Minigastrin.	-47-
Abb. 3.5	Nacktmäuse 4 h nach Injektion von Cy5.5-Minigastrin, Fluoreszenzbilder (A-B). Die Tumore sind mit Pfeilen markiert.	-48-
Abb. 3.6	Nacktmäuse 4 h nach Injektion von Cy5.5-Minigastrin, Fluoreszenzbilder (A-B). Die Tumore sind mit Pfeilen markiert.	-49-
Abb. 3.7	Mittlere Fluoreszenzintensitäten 4 h nach Injektion von Cy5.5-Minigastrin	-49-
Abb. 3.8	Nacktmäuse 4 h nach Injektion von Cy5.5-Minigastrin, 2.Versuchsansatz, Fluoreszenzbilder (A-D). Die Tumore sind mit Pfeilen markiert.	-50-
Abb. 3.9	Mittlere Fluoreszenzintensitäten 4 h nach Injektion von Cy5.5-Minigastrin im wiederholten Versuchsansatz.	-51-

Abb. 3.10	Kontrolle des Reaktionsablaufs zur Synthese von Cy5.5-Herceptin®, oben UV-Vis-Kanal1 (674 nm), unten UV-Vis-Kanal 2 (280 nm).	-52-
Abb. 3.11	Cy5.5-Herceptin® nach der Aufreinigung, oben UV-Vis-Kanal1 (674 nm), unten UV-Vis-Kanal2 (280 nm).	-53-
Abb. 3.12	Darstellung der Bindungsaffinität von Herceptin® zum Erb/Her2-Rezeptor.	-54-
Abb. 3.13	Darstellung der Bindungsaffinität von Cy5.5-Herceptin® zum ErbB/Her2-Rezeptor.	-55-
Abb. 3.14	SKOV3-Zellen nach 30 min Inkubation mit Cy5.5-Herceptin®, Fluoreszenzbild (A), Nativbild (B), fusioniertes Bild (C).	-56-
Abb. 3.15	SKOV3-Zellen nach 3 h bis 4 h Inkubationszeit mit Cy5.5-Herceptin®. Fluoreszenzbild (A), Nativbild (B), fusioniertes Bild (C).	-57-
Abb. 3.16	SKOV3-Zellen nach 24h Inkubation mit Cy5.5-Herceptin®. Fluoreszenzbild (A), Nativbild (B), fusioniertes Bild (C).	-58-
Abb. 3.17	Nacktmäuse 4 h nach Injektion des Cy5.5-markierten Antikörpers. Nativbild (A), Fluoreszenzbild (B). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.	-59-
Abb. 3.18	Nacktmaus 24 h nach Injektion des Cy5.5-markierten Herceptins®. Fluoreszenzbild (A), farbkodiertes Bild (B), Photographie (C). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.	-60-
Abb. 3.19	Nacktmäuse 24 h nach Injektion des Cy5.5-markierten Herceptins®. Fluoreszenzbilder (A, B).	-61-

Abb. 3.20	Mittlere Fluoreszenzintensitäten 24 h nach Injektion von Cy5.5-Herceptin. Es zeigt sich eine deutliche Fluoreszenz im Bereich des Tumors, der Leber und der Milz.	-61-
Abb. 3.21	Nacktmäuse 48 h nach Injektion des Cy5.5-markierten Herceptins®, Fluoreszenzbilder (A, B). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.	-62-
Abb. 3.22	Mittlere Fluoreszenzintensitäten des ErbB/Her2 positiven Tumors, der Milz und Referenzgewebes 48 h nach Injektion von Cy5.5-Herceptin.	-63-
Abb. 3.23	Nacktmäuse 72 h nach Injektion des Cy5.5-markierten Herceptins®, Fluoreszenzbilder (A, B). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.	-63-
Abb. 3.24	Mittlere Fluoreszenzintensitäten des ErbB/Her2 positiven Tumors, der Milz und Referenzgewebes 72 h nach Injektion von Cy5.5-Herceptin.	-64-
Abb. 3.25	Präparation der F(ab') ₂ -Fragmente von Herceptin® durch Pepsinverdau, gezeigt ist der UV-Vis-Kanal 2 (280 nm).	-65-
Abb. 3.26	Herceptin® ist vollständig in F(ab') ₂ -Fragmente gespalten worden, vom Fc-Fragment sind nur noch Fragmentbruchstücke vorhanden, gezeigt ist der UV-Vis-Kanal2 (280 nm).	-66-
Abb. 3.27	Kontrolle des Reaktionsablaufs der Synthese von Cy5.5-F(ab') ₂ , oben UV-Vis-Kanal1 (674 nm), unten UV-Vis-Kanal2 (280 nm).	-67-
Abb. 3.28	Cy5.5-F(ab') ₂ -Fragmente nach der Aufreinigung, oben UV-Vis-Kanal1 (674 nm), unten UV-Vis-Kanal2 (280 nm).	-68-

Abb. 3.29	Darstellung der Bindungsstudie von Cy5.5-F(ab') ₂ zum Her2-Rezeptor.	-69-
Abb. 3.30	Darstellung der Bindungsaffinität von Cy5.5-F(ab') ₂ zum ErbB/Her2-Rezeptor im Vgl. zu 111In-F(ab') ₂ .	-70-
Abb. 3.31	SKOV3-Zellen nach 30 min Inkubation mit Cy5.5-F(ab') ₂ -Fragmenten, Fluoreszenzbild (A), Nativbild (B), fusioniertes Bild (C).	-70-
Abb. 3.32	SKOV3-Zellen nach 120 min Inkubation mit Cy5.5-F(ab') ₂ -Fragmenten. Fluoreszenzbild (links oben), Nativbild (rechts oben), fusioniertes Bild (links unten).	-71-
Abb. 3.33	SKOV3-Zellen nach 9 h Inkubation mit Cy5.5-F(ab') ₂ -Fragmenten. Fluoreszenzbild (A), Nativbild (B), fusioniertes Bild (C).	-72-
Abb. 3.34	Nacktmäuse 30-60 min nach Injektion von Cy5.5-F(ab') ₂ , Fluoreszenzbilder (A,B). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.	-73-
Abb. 3.35	Mittlere Fluoreszenzintensitäten 30-60 min nach Injektion von Cy5.5-F(ab') ₂ , Starke Fluoreszenz in der Milz und Abdomen im Vergleich dazu nur schwache Fluoreszenz im Bereich des Tumors.	-74-
Abb. 3.36	Nacktmäuse 4 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab') ₂ , Fluoreszenzbilder (A,B). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.	-74-
Abb. 3.37	Mittlere Fluoreszenzintensitäten 4h nach Injektion von Cy5.5-F(ab') ₂ , Starke Fluoreszenz in der Milz und Abdomen im Vergleich dazu nur schwache Fluoreszenz im Bereich des	-75-

Tumors.

Abb. 3.38	Mittlere Fluoreszenzintensitäten 24h nach Injektion von Cy5.5-F(ab') ₂ , Kaum ein Unterschied zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe ohne Fluoreszenz.	-75-
Abb. 3.39	Nacktmäuse 21-24 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab') ₂ , Fluoreszenzbilder (A-D). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.	-76-
Abb. 3.40	48 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab') ₂ , Fluoreszenzbilder (A,B). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.	-77-
Abb. 3.41	Mittlere Fluoreszenzintensitäten 48 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab') ₂ . Kein Unterschied zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe ohne Fluoreszenz.	-77-
Abb. 3.42	72 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab') ₂ , Fluoreszenzbilder (A-B). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.	-78-
Abb. 3.43	Mittlere Fluoreszenzintensitäten 72 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab') ₂ . Kein Unterschied zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe ohne Fluoreszenz.	-78-
Abb. 3.44	Verlaufskontrolle der Spaltung der F(ab') ₂ -Fragmente in F(ab')-Fragmente, gezeigt ist der UV-Vis-Kanal2 (280 nm).	-79-
Abb. 3.45	F(ab')-Fragmente nach Filtration, gezeigt ist der UV-Vis-Kanal2 (280 nm).	-80-
Abb. 3.46	Verlaufskontrolle der Synthese von Cy5.5-F(ab')-Fragment von Herceptin®, oben UV-Vis-Kanal1 (674 nm), unten UV-Vis-Kanal2 (280 nm).	-81-

Abb. 3.47	Cy5.5-F(ab') nach der Filtration, oben UV-Vis-Kanal1 (674 nm), unten UV-Vis- Kanal2 (280 nm).	-81-
Abb. 3.48	Darstellung der Bindungsaffinität von Cy5.5-F(ab') zum Her2- Rezeptor.	-82-
Abb. 3.49	Darstellung der Bindungsaffinität von Cy5.5-F(ab') zum Her2- Rezeptor verglichen mit 111In-F(ab')-Fragment.	-83-
Abb. 3.50	Darstellung der Bindungsaffinitäten von Cy5.5-F(ab') ₂ und Cy5.5-F(ab') im Vergleich.	-83-
Abb. 3.51	Darstellung der Bindungsaffinitäten von Cy5.5-F(ab') ₂ , Cy5.5- F(ab') und Herceptin® im Vergleich	-84-
Abb. 3.52	SKOV3 Zellen nach 30 min Inkubation mit Cy5.5-F(ab')- Fragment. Fluoreszenzbild (A), Nativbild (B), fusioniertes Bild (C).	-85-
Abb. 3.53	SKOV3 Zellen nach 120 min Inkubation mit Cy5.5-F(ab')- Fragment. Fluoreszenzbild (A), Nativbild (B), fusioniertes Bild (C).	-86-
Abb. 3.54	SKOV3 Zellen nach 9 h Inkubation mit Cy5.5-F(ab')-Fragment. Fluoreszenzbild (A), Nativbild (B), fusioniertes Bild (C).	-87-
Abb. 3.55	Nacktmaus 4 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab'): Nativbild (A), Fluoreszenzbild(B), farbkordiertes Schema (C). Die HER2- positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.	-88-
Abb. 3.56	Mittlere Fluoreszenzintensitäten 4 h nach Injektion von Cy5.5- F(ab')-Fragment.	-89-

Abb. 3.57	Mittlere Fluoreszenzintensitäten 24 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab')-Fragment. Deutliches Fluoreszenzsignal in Milz und Tumor.	-89-
Abb. 3.58	Nacktmaus 24 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab), Nativbild (A), Fluoreszenzbild (B), farbkodiertes Bild (C). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.	-90-
Abb. 3.59	Nacktmäuse 48 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab'); Fluoreszenzaufnahme (A,D), Nativbild (C), farbkodiertes Bild (B). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert. Die Tumore sind mit Pfeilen markiert.	-91-
Abb. 3.60	Mittlere Fluoreszenzintensitäten 48 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab')-Fragment. Deutliches Fluoreszenzsignal in Milz und Tumor.	-92-
Abb. 3.61	Mittlere Fluoreszenzintensitäten 72 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab')-Fragment. Deutliches Fluoreszenzsignal in Milz und Tumor. Schlechtes Signalrauschverhältnis.	-92-
Abb. 3.62	72 h nach Injektion von Cy5.5-F(ab'); Fluoreszenzaufnahme (A,D), Nativbild (B), farbkodiertes Bild (C). Die HER2-positiven Tumoren sind mit Pfeilen markiert.	-93-

8.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.0	CCK-Rezeptor Inzidenz in Tumoren. (Reubi, Schaer, Waser, 1997; Schaer, Reubi, 1999)	-13-
Tabelle 2.1	Allgemeine Laborgeräte	-24-
Tabelle 2.2	Zellkulturgeräte	-24-
Tabelle 2.3	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	-26-
Tabelle 2.4	Zellkulturmaterialien	-26-
Tabelle 2.5	Zellkulturmedien und Zusätze	-27-
Tabelle 2.6	Tierversuche	-28-
Tabelle 2.7	Spezielle Analysengeräte	-29-
Tabelle 2.8	Spezielle Chemikalien	-30-
Tabelle 2.9	Computerprogramme	-30-
Tabelle 3.1	Übersicht über die ermittelten IC ₅₀ -Werte aus den Bindungsstudien	-79-
Tabelle 3.2	Zeitabhängige Tumorfluoreszenzintensität (Lichtemission bei λ = 694 nm, als Quotient zwischen der mittleren Intensität des Tumors und normalem Mausgewebe)	-94-

9. Abkürzungsverzeichnis

$^{111}\text{InCl}_3$	Indiumchlorid
^{131}I	Radioaktives Isotop des Elements Iod
AK	Antikörper
a.u.	Arbitrary units (willkürliche Einheiten)
BSA	Bovines Serum Albumin
CCD	<i>charge-coupled-device</i>
CCK	Cholecystokinin
Ci	Curie, 1 Ci = $37 \cdot 10^9$ Becquerel
cpm	Counts per minute
CT	Computertomographie
Cy5.5	CyDye, Fluoreszenzfarbstoff
DAG	Diacylglycerin
DMEM	Zellkulturmedium
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DTPA	Diethylentriaminpentaacetat

9. Abkürzungsverzeichnis

ECD	<i>extracellular domain</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
F(ab') Fragment	Antikörperfragment mit einer Antigenbindungsstelle
F(ab') ₂ -Fragment	Antikörperfragment mit zwei Antigenbindungsstellen
FACS	Fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
Fc-Fragment	Antikörperfragment, das nicht an der Antigenbindung beteiligt ist.
FCS	Fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FMT	molekulare Fluoreszenztomographie
FRI	<i>Fluorescence reflectance imaging</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Glu	Glutamin

9. Abkürzungsverzeichnis

GRS	Gastrin-Rezeptor-Szintigraphie
GTP	Guanosintriphosphat
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol * H ₂ O
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
IC ₅₀	Inhibitorische Konzentration 50%
IHC	Immunhistochemie
IMDM	Zellkulturmedium
IP ₃	Inositoltrisphosphat
kD	10 ³ Dalton, 1 D = 1,66 · 10 ⁻²⁷ kg
K _D - Wert	Verteilungskoeffizient, reziprok zur Affinität
MOPS	3-(<i>N</i> -morpholino)propansulfonsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NaOAc	Natriumacetat
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NIR	nahinfrarot
NIRF	<i>Near Infrared Fluorescence</i>

9. Abkürzungsverzeichnis

NYHA	New York Heart Association
PET	Positronen-Emissions-Computer-Tomographie
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
Rcf	<i>relative centrifugal force</i> , relative Zentrifugalkraft
RES	retikuloendotheliales System
RT	Raumtemperatur
SKBR3	Zelllinie, Her2 pos. Brustkrebszellen
SKOV3	Zelllinie, Her2 pos. Ovarialkrebszellen
SPECT	<i>Single-Photon-Emission-Computer-Tomographie</i>
SRS	Somatostatinrezeptorszintigraphie
TFA	Trifluoressigsäure

10. Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

An der Philipps- Universität Marburg:

Adamkiewicz, Aigner, Alfke, Aumüller, Arnold, Basler, Baum, Baumann, Barth, Barth, Becker, Behr, Behe, Bien, Büch, Christiansen, Cetin, Czubayko, del Rey, Daut, Dalchow, Duda, Dünne, Engenhardt, Eilers, Feuser, Funk, Gerdes, Garrel, Geus, Görg, Görg, Gotthardt, Gotzen, Gudermann, Grimm, Griss, Grzeschik, Hadji, Hasilik, Herzum, Hofmann, Höffken, Hörle, Jungclas, Kann, Kern, Kill, Kim-Berger, Klenk, Klose, Koolmann, Köhler, Krause, Kretschmer, Kroll, Krieg, Lang, Leonhardt, Lill, Lohoff, Maisch, Maier, Mandrek, Mennel, Moll, Moosdorf, Mutters, Müller, Neubauer, Oertel, Remschmidt, Renz, Röhm, Röper, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schu, Schulze, Sekundo, Schüffel, Schurrat, Schrader, Schwarz, Seyberth, Seitz, Strassmann, Steiniger, Studer, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Wagner, Weihe, Wennemuth, Westermann, Werner, Wulf

An der Goethe- Universität Frankfurt am Main:

Gätje, Kaufmann, Louwen, Rody, Siebzehnrübl

An der LMU München:

Baur-Melnik, Becker, Beuers, Buske, Demmel, Glaser, Göke, Hiddemann, Niedermeier, Reiser, Ruppert, Schmidt, Schönberg, Wagner

11. Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Heiko Alfke für die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas und die Möglichkeit zur Promotion.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Martin Behe für seine großartige Unterstützung, er stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite und hatte immer ein offenes Ohr für aufgetretene Probleme.

Weiter geht mein herzlicher Dank an Frau Birgit Herbst-Brück, Frau Beate Kleb und Frau Ursula Cramer, die besten MTAs, die ich kenne. Wenn ich Hilfe brauchte, waren sie stets zur Stelle.

Ich danke auch Herrn Dr. Achim Aigner aus dem Institut für klinische Pharmakologie für die Bereitstellung des verwendeten Tumormodells und die große Unterstützung bei den konfokalen Mikroskopieversuchen, sowie für manchen guten Tipp.

Herrn Prof. Dr. Thomas Behr danke ich recht herzlich für die konstruktive Diskussion der gewonnenen Ergebnisse.

Meinen Mitdoktoranden, darunter besonders Frau Anne Kastner und Jens Obersheimer, möchte ich ebenfalls einen Dank aussprechen. Sie waren mir oftmals eine moralische Stütze und es war schön zu sehen, dass es anderen genauso geht wie einem selbst.

Meiner Familie möchte ich für ihre in jeder Hinsicht große Unterstützung während meines Studiums danken. Von ganzem Herzen möchte ich meinem Freund Christian Wirges für seinen Rat und seine vielfältige Hilfe danken. Es ist schön, dich an meiner Seite zu wissen.

